



Méthylations de l'histone H3 et contrôle épigénétique des propriétés des cellules souches de gliomes

Alexandra Bogeas

► **To cite this version:**

Alexandra Bogeas. Méthylations de l'histone H3 et contrôle épigénétique des propriétés des cellules souches de gliomes. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. <NNT : 2013PA05P620>. <tel-01170633>

HAL Id: tel-01170633

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01170633>

Submitted on 2 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université Paris Descartes PARIS V
Ecole Doctorale MTCE
«Médicament, Toxicologie, Chimie et Environnement»**

THÈSE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE PARIS V

Spécialité : Neurosciences

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris V

Présentée par

Alexandra BOGEAS

Méthylations de l'histone H3 et contrôle épigénétique des propriétés des cellules souches de gliomes

Thèse dirigée par le Dr Hervé CHNEIWEISS

Soutenue le 29 Novembre 2013

Devant le Jury composé de :

Madame le Docteur Sylvie ROBINE

Monsieur le Professeur Jacques HAIESH

Madame le Professeur Penelope KORKOLOPOULOU

Monsieur le Docteur Ahmed IDBAIH

Madame le Docteur Isabelle PLO

Monsieur le Docteur Hervé CHNEIWEISS

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

"C'est par l'expérience que la science et l'art font leur progrès chez les hommes."
Aristote

A ma famille et amis,

Remerciements

Comment conclure cette aventure de quatre ans sans remercier toutes les formidables personnes rencontrées et sans qui cette thèse n'aurait jamais pu aboutir ?

Aux membres de mon jury, le Dr Sylvie ROBINE, le Pr Jacques HAIESH, le Pr Penelope KORKOLOPOULOU, le Dr Ahmed IDBAIH et le Dr Isabelle PLO, je vous remercie d'avoir fait l'honneur d'évaluer cette thèse, et en particulier aux rapporteurs, le Pr HAIESH et le Pr KORKOLOPOULOU pour vos remarques, vos conseils et corrections de ce manuscrit.

A Hervé, un immense merci pour m'avoir fait confiance et m'avoir choisi pour effectuer cette thèse au sein de votre laboratoire. Vous avez toujours été à l'écoute, disponible malgré votre emploi du temps de ministre. Merci de m'avoir fait partager votre passion pour la science, et vous écouter parler de science fut toujours un immense plaisir.

A Marie-Pierre, de simples mots ne suffiraient pas pour exprimer ma gratitude envers toi. Tu as toujours été là pour sortir le meilleur de moi-même. Très patiente avec moi, tu as réussi à me motiver, me donner de précieux conseils, m'encourager, m'enseigner la rigueur nécessaire, me transmettre ton dévouement envers la recherche. Je te suis infiniment redevable pour tout ce que tu m'as apporté.

A Amélia, ma deuxième maman, merci pour ton aide, aussi bien morale que physique. Tu m'as toujours soutenu, écouté, étant toujours franche et n'hésitant pas à me remettre les idées en place quand c'était nécessaire ! La vie au

laboratoire n'aurait pas été la même sans toi. Tu sais combien tu as été et est importante pour moi.

A mes collègues et amis maintenant pour la vie,

Salwa, ma zouina Salwa adorée, que dire de toi à part que je te déteste ! Bon trêve de plaisanterie, tu sais bien que c'est tout le contraire, de toute façon avec toi c'est impossible que je te mente, tu lis en moi ! Depuis le jour où tu as mis les pieds dans le laboratoire, une complicité s'est tout de suite installée, qui s'est consolidée durant toutes ces années et qui ne pourra jamais être brisée. Merci pour tes conseils, l'immense aide que tu m'as apportée et les crises de rire ! A bientôt au Maroc et ailleurs !

Gustavo, meu amor, mon complice, merci à Vivaldo de t'avoir laissé venir à Paris ! Tu sais combien ta présence, ton soutien, ton amitié, ton aide a été précieuse pour moi. Merci de m'avoir fait découvrir ton pays, le Brésil, autrement que les clichés. Je n'oublierai jamais tous ces merveilleux moments passés ensemble (la bande des quatre !) et j'attends avec impatience tous les autres moments à venir ! A bientôt au Brésil et ailleurs !

Elias, que dire de toi ! Tu es le « petit » (façon de parler !) dernier de la bande à avoir débarqué au laboratoire. Mais pas le moins important au contraire ! Tu as su nous guider tous les trois, nous transmettre ton expérience. Tu as été d'une aide immense tout le long de cette thèse, surtout à la fin d'ailleurs, et cette thèse n'aurait pas été la même sans toi ! Merci de ta patience, d'avoir supporté mes « petites » crises, de ton humour parfois difficile à déceler ! Mon allié grec qui me corrige encore et encore sur mon grec ! Ξερεis οτι θα εισαι παντα για μενα στην καρδια μου.

Je n'oublie pas mes anciens collègues, Cécile et Silvina. Merci à Cécile de m'avoir si bien accueillie lors de mon arrivée au laboratoire, tu as été une enseignante géniale, une amie et confidente, un soutien dans ce début de thèse sans faille et merci pour tous ces fous rire partagés. A ma petite Silvina qui a bien grandi,

merci infiniment pour toutes ces immuno passées ensemble, à ta patience pour toutes mes demandes ! Je n'oublierai jamais ces moments passés ensemble !

Aux autres membres du laboratoire, Jeanne-Marie, Joanna, merci infiniment pour toute votre aide et échanges qu'on a pu avoir. Vous avez toujours été là quand j'avais besoin de vous et je vous en remercie. Merci également à tout le service d'anapat' en particulier à Aurélien.

A mes collaborateurs,

A l'équipe de Michèle Goodhart (Klaudia, Isabelle, Dounia, Meriem, David) à l'hôpital Saint-louis et en particulier Michèle elle-même, un immense merci pour m'avoir aussi bien accueillie au sein de votre laboratoire. Vous avez su m'enseigner, chercher, comprendre, explorer les secrets de la technique du CHIP.

A l'équipe de Christian Neri, et en particulier à François-Xavier, sans qui cette thèse n'aurait pas pu aboutir. Merci infiniment pour ton aide, ton enseignement de la bioinformatique et ta patience sans faille à mes demandes qui n'en finissaient pas !

A l'équipe de Thierry Virolle à Nice, à la plateforme MGX de Montpellier, la plateforme IGBMC de Strasbourg, la plateforme de bioinformatique de la société GenoSplice Technology.

A mes amis,

Aux filles, Amal, Anais, Asta, Btissam, Meriem, Najah, Thao, merci pour votre amitié, votre soutien moral, merci d'être vous, et d'avoir toujours été là dans les bons comme les mauvais moments !

Merci à Aurélie et Lisa, mes amies de toujours, vous avez toujours été à mes côtés, malgré mon absence surtout à la fin !

Je tiens également à remercier mes premiers mentors qui m'ont fait aimer et découvrir la science, Darek Gorecki, Gilles Mirambeau et en particulier Catherine Rougeot qui m'a transmis sa passion pour la science, merci de m'avoir accueillie

en master 2 et de m'avoir sans cesse soutenu (merci à Evelyne Dufour également !).

Enfin, en dernier mais pas le moindre, merci à ma grande et belle famille. Merci à mes grands-parents, mes tantes, oncles et cousins, en France comme en Grèce, et évidemment, merci à mes parents et à mes trois sœurs sur qui j'ai toujours pu compter et qui ont été et sont d'un soutien sans faille. Sans vous je n'en serai pas là. Σας ευχαριστω παρα πολυ για ολα, σας αγαπω πολυ.

A ceux oublié, je m'en excuse mais sachez que toutes les personnes rencontrées ont été importantes pour moi.

Résumé

Les gliomes sont les tumeurs primitives les plus fréquentes du cerveau et restent de mauvais pronostic en raison de l'inefficacité des traitements actuels. Des cellules souches cancéreuses ont été isolées à partir de gliomes de haut grade de l'adulte. Ces cellules souches de gliomes (GSC) peuvent fournir tous les sous-types cellulaires qui composent la tumeur. De nombreuses données indiquent que la résistance aux traitements est due en grande partie aux GSC. Cibler les GSC et leurs propriétés souches constitue donc un enjeu thérapeutique important.

J'ai d'abord participé à déterminer la présence de GSC dans les gliomes pédiatriques. Nous avons ainsi pu isoler des GSC de gliomes pédiatriques de différents types et grades.

Parvenir à cibler les GSC implique également de caractériser les voies moléculaires qui gouvernent leurs propriétés de façon spécifique afin d'épargner les cellules souches neurales normales (NSC). Dans ce cadre, j'ai participé à démontrer les effets toxiques du resvératrol sur les GSC et à déterminer les voies moléculaires qui sous-tendent la spécificité de ses effets, ce polyphénol n'agissant pas sur les NSC.

Une solution pertinente de ciblage thérapeutique est de forcer les GSC à quitter leur état souche. Dans ce cadre, mes principaux travaux ont eu pour but de caractériser les changements épigénétiques des marques d'histones qui accompagnent la répression des propriétés des GSC par un groupe de micro-ARN, miR-302-367. Les GSC présentent une plasticité exceptionnelle leur permettant d'acquérir ou de perdre leurs propriétés en réponse aux signaux de leur environnement. L'étude de cette plasticité par notre équipe a abouti à l'identification de miR-302-367. Son expression forcée, à l'aide de lentivirus, bloque de façon irréversible les propriétés souches et initiatrices de tumeur des GSC. L'effet suppresseur de tumeur exercé par miR offre la possibilité d'identifier les mécanismes qui régulent le maintien ou la perte des propriétés des GSC. À l'aide d'un modèle formé par une lignée de GSC et de sa contrepartie dépourvue des propriétés souches et tumorigènes GSC-miR-302-367, je me suis attachée à caractériser les méthylations de l'histone H3, qui font parties du code d'histone associé à une transcription génique respectivement active ou réprimée. Je me suis axée sur la triméthylation de la lysine 4 (H3K4me3) et de la lysine 27 (H3K27me3), respectivement permissive et répressive de la transcription. Une analyse par ChIP-seq (Immunoprécipitation de la chromatine-séquençage) des gènes associés à ces marques a été associée à la caractérisation des transcriptomes des cellules par exon-array.

Nos résultats montrent que l'expression du groupe de miR-302-367 ne modifie pas de façon globale les taux des marques H3K4me3 et H3K27me3. Par contre, des changements dans des groupes de gènes circonscrits ont pu être identifiés. La corrélation positive observée entre les marques d'histones et les taux d'expression des gènes montre une conservation du code d'histone dans les cellules cancéreuses, au moins pour les marques étudiées. L'analyse des termes GO (Gene Ontology) indique que la perte des propriétés induites par miR-302-367 s'accompagne d'un engagement de GSC dans une voie de différenciation. Les gènes portant la marque répressive dans les GSC-miR-302-367 participent notamment à des catégories fonctionnelles associées à l'expression de propriétés souches et tumorigènes. L'analyse du groupe de gènes portant une marque permissive dans les GSC et répressive dans les GSC-miR-302-367, a révélé un réseau de facteurs de transcription susceptible de participer au contrôle des propriétés souches des GSC. La répression à l'aide de siRNA d'un des membres de ce réseau, le facteur de transcription ARNT2, nous a permis de révéler son rôle dans le maintien des capacités prolifératives des GSC issues de gliomes distincts et dans l'expression du facteur de transcription Nanog, connu pour son rôle central dans le contrôle des propriétés souches des GSC.

Nos résultats montrent que l'analyse des changements de marques d'histone offre donc non seulement une vue d'ensemble des différents réseaux moléculaires associés au maintien

ou au contraire à la répression des propriétés des GSC, mais permet d'identifier de nouveaux acteurs. L'effet stimulateur d'ARNT2 sur la croissance cellulaire et l'expression de Nanog, dans des GSC dérivées de gliomes différents aux altérations génomiques distinctes, indique que ce facteur de transcription tient une place centrale, insoupçonnée jusqu'à présent, dans la hiérarchie des gènes qui gouvernent les propriétés des GSC.

Abstract

Gliomas, the most frequent primary brain tumors, are resistant to current therapies and the survival rate of patients is very low. Within high-grade gliomas, a cell sub-population bearing stem-like properties has been isolated. These cells, called glioma stem cell (GSC), are capable of generating all glioma cellular sub-types. Recent data indicates that resistance of these aggressive tumors to therapies is mostly due to GSCs. Thus, targeting the GSCs and their stem-like properties is imperative in order to improve current therapies.

First, I participated in a project aiming at identifying the presence of GSCs in pediatric gliomas. We were able to isolate such cells from pediatric gliomas of different type and malignant grade.

Targeting GSCs in a specific manner and sparing normal neural stem cell (NSC) requires the elucidation of the molecular pathways that regulate the stem-like properties of GSCs. For this purpose, I participated in a study highlighting the toxic effects of resveratrol on GSCs without affecting NSCs, and we, further, deciphered the molecular pathways responsible for its specific effects.

Another effective solution to treat GSCs is to force them to lose their stem-like properties. In this context, the aims of my major project were to characterize the epigenetic modifications of histone marks accompanying the loss of GSC stem-like properties under the influence of a cluster of micro-RNA, miR-302-367. GSCs are endowed with an exceptional plasticity, allowing them to gain or lose their stem-like state in response to modifications in their micro-environment. Our results identified the implication of miR-302-367 in the regulation of GSC plasticity. Its stable expression using lentivirus inhibits in an irreversible manner the stem-like and tumorigenic properties of GSC. The tumor-suppressor effect of this miR offers the possibility to decipher the mechanisms responsible for the maintenance or the loss of GSC stem-like properties. Using the model of GSC and their counterparts, GSC-miR-302-367, who lost their stem-like and tumorigenic properties, my aim was to identify the methylation status of histone H3 of the histone code which is known to be associated either to an active or to a repressive gene transcription. I focused on the trimethylation of lysine 4 (H3K4me3) and lysine 27 (H3K27me3), which are associated with an activation or repression of gene transcription, respectively. We performed a ChIP-seq (Chromatin-immunoprecipitation-sequencing) analysis of the respective associated genes followed by a transcriptomic (exon-array) analysis of both cell lines.

Our results show that miR-302-367 expression does not alter in a global manner the expression levels of H3K4me3 and H3K27me3. On the contrary, we were able to detect modifications in a discrete group of genes. At least for the studied marks, the positive correlation between the identified histone marks and the gene expression levels indicates that the histone code is well preserved in cancer. GO (Gene Ontology) analysis indicates that miR-302-367-induced loss of stem-like properties is accompanied with activation of the differentiation process in GSC. Genes implicated in the regulation of stem-like and tumorigenic properties were found to bear the repressive histone mark in GSC-miR-302-367. From our analysis of the group of genes bearing the active histone mark in GSC and the repressive one in GSC-miR-302-367, emerged a network of transcription factors that could possibly participate in the regulation of GSC stem-like properties. Down-regulation using siRNA of a member of this network, namely ARNT2, highlighted its role in the maintenance of the proliferative dynamic, as well as the expression of the transcription factor Nanog (a major regulator of GSC stem-like properties), in GSC derived from distinct gliomas.

Our histone mark modification analysis, not only elucidated the molecular pathways implicated in the maintenance or, on the contrary, in the loss of GSC stem-like properties, but also, highlighted the implication of new actors in these processes. The activator effect of ARNT2 on GSC proliferation, as well as on the expression of Nanog, observed in GSC bearing distinct

genetic alterations and derived from different glioma, indicates that this transcription factor plays a major role, not documented thus far, in the regulation of GSC stem-like properties.

Sommaire

Table des illustrations	16
Abréviations	20
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	25
Chapitre 1 : Les gliomes	26
1.1. Généralités	26
1.2. Classification des gliomes	28
1.2.1. Classification selon les critères histologiques	28
1.2.2. La génétique des gliomes.....	33
1.2.3. Profils transcriptomiques des glioblastomes	34
1.2.4. Comparaison des gliomes adultes et des gliomes enfants	37
1.3. Les cellules souches cancéreuses.....	38
1.3.1 Auto-renouvellement.....	40
1.3.2. Clonalité	41
1.3.3. Expression de marqueurs de cellules souches.....	41
1.3.4. Initiation de la formation des tumeurs : propriétés tumorigènes	42
1.4. Origine cellulaire des gliomes	42
1.4.1. <i>in vitro</i>	42
1.4.2. <i>in vivo</i> , modèles de souris	43
Chapitre 2 : Epigénétique	44
2.1. Le Concept d'épigénétique	45
2.2. Le « code épigénétique » des histones	49
2.2.1. Méthylation des histones.....	53

2.2.1.1. Découverte.....	53
2.2.1.2. Mécanismes de méthylation des lysines K4 et K27 de l’histone H3 : Lysines méthyltransférases (KMTs) et Lysines déméthylases (KDMs)	54
2.2.1.3. Marque active H3K4me3	60
a. Les « writers »	61
b. Les « readers »	62
c. Les « erasers »	62
2.2.1.4. Marque répressive H3K27me3	63
a. Les « writers »	65
b. Les « readers »	65
c. Les « erasers »	65
2.2.1.5. Marque Bivalente.....	66
2.3. H3K4me3, H3K27me3 et différenciation cellulaire	67
2.4. H3K4me3, H3K27me3 et cancer	68
Matériels et méthodes.....	73
1. Matériel.....	74
1.1. Matériels, appareils	74
1.2. Matériel biochimique.....	75
1.3. Matériel biologique.....	79
2. Méthodes	81
2.1. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	81
2.2. Séquençage à haut débit.....	82
2.3. Analyse de l’expression des gènes	82
2.3.1 Préparation des ARN	82
2.3.2. PCR quantitative (qPCR).....	83
2.3.3. Puces à ADN (microarray expression).....	83

2.4. Analyses des CHIP-seq et du transcriptome.....	84
2.4.1. Répartition des gènes selon leur association avec les marques d’histone H3K4 et H3K27 dans les analyses CHIP-seq.....	84
2.4.2. Comparaison des CHIP-seq avec l’analyse transcriptomique	84
2.4.3. Profils d’expression de l’analyse transcriptomique	85
2.4.4. Analyse du changement des profils H3K4me3 et H3K27me3 accompagnant la perte des propriétés souches et tumorigènes des GSC	85
2.4.5 Analyse fonctionnelle : Gene Ontology (Go term).....	86
2.5. Viabilité et prolifération cellulaires par test d’exclusion du bleu Trypan.....	86
2.6. Western Blot	87
2.7. Immunocytochimie	87
2.8. Transfection des siARN	88
2.9. Dosage de la luciférase par des gènes rapporteurs.....	88
2.10. Statistiques.....	88
Résultats expérimentaux	89
Partie 1 : Isolation et caractérisation des cellules souches cancéreuses dérivées des gliomes pédiatriques	90
A. Introduction à l’étude menée.....	91
B. Article n°1	92
C. Conclusion.....	93
Partie 2 : Effets du resvératrol sur les GSC et les NSC	94
A. Introduction à l’étude menée.....	95
B. Article n°2	96
C. Conclusion.....	97
Partie 3 : Méthylations de l’histone H3 et contrôle épigénétique des propriétés des cellules souches de gliomes.....	98
A. Introduction et objectif de l’étude menée	99

B. Résultats expérimentaux	101
1. Approche expérimentale et résultats généraux	101
2. Profil épigénétique des marques histones H3K4me3 et H3K27me3 dans les GSC et les GSC-miR-302-367	102
3. Profil transcriptomique comparatif des GSC et des GSC-miR-302-367	106
4. Corrélation positive entre les marques d’histone et les taux d’expression des gènes.....	109
5. Changement des profils H3K4me3 et H3K27me3 accompagnant la perte des propriétés souches et tumorigènes des GSC.....	114
6. Analyse fonctionnelle des changements de marque d’histone	116
7. ARNT2 est essentiel à la maintenance de l’état souche des GSC	125
Discussion générale.....	130
1. Caractérisation et ciblage thérapeutique des GSC	131
2. Conservation du code d’histone dans les GSC.....	133
3. Signification des changements de marques d’histone accompagnant la répression des propriétés des GSC par miR-302-367	136
4. Un rôle insoupçonné d’ARNT2 dans le maintien des propriétés souches des GSC.	139
5. Conclusions et perspectives.....	142
Annexes	144
Annexe 1 : Protocole détaillé du CHIP-seq.....	145
1. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	145
1.1. Fixation des cellules :	147
1.2. Lyse et Sonication :	149
1.3 Vérification de la qualité de la coupure de la chromatine :.....	151
1.4 Immunoprécipitation de la Chromatine :	154
1.5 Lavages des billes magnétiques :	154
1.6 Purification et extraction de l’ADN :	155

2. Séquençage à haut débit.....	158
2.1. Préparation de la banque de CHIP-Seq	158
2.2. Génération des clusters et hybridation du primer de séquençage	158
2.3. Le séquençage.....	159
2.4. Informatique	160
Annexe 2	162
1. Description de l'expérience de CHIP-seq et résultats	162
1.1 Analyse qualité de la piste contrôle	162
1.1.1 Qualité des séquences par base	163
1.1.2 Qualité des séquences	164
1.1.3 Teneur en base N	165
1.2. Analyse qualité des échantillons.....	166
1.2.1 Qualité des séquences par base	166
1.2.2 Qualité des séquences	167
1.2.3 Teneur en base N	169
1.3 Résultats du séquençage et de l'alignement	169
2. Analyses statistiques	170
2.1 Diversité et couverture	171
2.2 Résultats de l'analyse sous MACS v1.4.2	172
3. Annotation des pics identifiés avec MACS v1.4.2	172
Annexe 3 : Tableau supplémentaire 1	174
BIBLIOGRAPHIE	187

Table des illustrations

Figures

Introduction. Chapitre 1 : Les gliomes

Figure 1 : Rôle des cellules gliales dans le système nerveux.....	26
Figure 2 : Histologie des astrocytomes selon l'OMS..	30
Figure 3 : Distribution des gliomes.....	31
Figure 4 : Principales altérations génétiques des glioblastomes primaires versus les glioblastomes secondaires.....	31
Figure 5 : Représentation schématique des voies de signalisation les plus dérégulées dans les gliomes humains.....	33
Figure 6 : Profils transcriptomiques et altérations génomiques identifiant des sous-types de glioblastomes.....	36
Figure 7 : Modèles hypothétiques de la tumorigenèse..	38
Figure 8 : Propriété des CSC : auto-renouvellement symétrique et asymétrique.....	41

Introduction. Chapitre 2 : Epigénétique

Figure 1 : Différents niveaux de compaction de la chromatine (a) et structure atomique du nucléosome (b)..	46
Figure 2 : Différents types d'information épigénétique.....	47
Figure 3 : Schéma représentatif de la biogénèse et du mécanisme d'action des microARNs dans les cellules mammifères.....	49
Figure 4 : Représentation schématique du nucléosome avec les modifications des histones..	50
Figure 5 : Mécanisme de l'acétylation des histones..	52
Figure 6 : Mécanismes de la phosphorylation des histones..	53
Figure 7 : Méthylation de la lysine par des lysines méthyltransférases (KMTs)..	55
Figure 8 : Mécanismes de déméthylation des lysines des histones..	57
Figure 9 : Implication de la méthylation et de la déméthylation des lysines d'histone catalysées par les méthyltransférases et les déméthylases dans la régulation de la transcription des gènes.....	59

Figure 10 : Majeure méthylation des lysines sur la partie N-terminales des histones H3 (violet) et H4 (bleu)..	61
Figure 11 : Fonctions moléculaires de PRC1 et PRC2.....	64
Figure 12 : Rôle des promoteurs bivalents dans le destin cellulaire.....	67
Figure 13 : Implication des H3K27me3 déméthylases dans la régulation transcriptionnelle des gènes du développement.....	68

Résultats expérimentaux : Partie 3 : Méthylations de l’histone H3 et contrôle épigénétique des propriétés des cellules souches de gliomes

Figure 1 : Schéma récapitulatif de l’étude menée sur les changements épigénétiques des marques H3K4me3 et H3K37me3 accompagnant la perte des propriétés souches et tumorigènes..	102
Figure 2 : Nombre de gènes identifiés portant les marques H3K4me3 et/ou H3K27me3 par ChiP-seq dans les GSC et les GSC-miR-302-367.....	103
Figure 3 : Distribution moyenne des marques H3K4me3 et H3K27me3 autour du TSS dans les GSC et les GSC-miR-302-367.....	104
Figure 4 : Nombres de gènes identifiés portant les marques H3K4me3 et/ou H3K27me3 au niveau de leur site de début de transcription dans les GSC et les GSC-miR-302-367.....	105
Figure 5 : L’expression de miR-302-367 ne modifie pas les quantités globales d’histone H3 ayant subi une tri-méthylation de leur lysine 4 ou 27.....	106
Figure 6: Profils d’expression distincts des patrons d’expression génique des GSC et des GSC-miR-302-367..	107
Figure Supplémentaire 1 : Heatmap des 500 transcrits les plus différenciellement régulés dans les GSC versus les GSC-miR-302-367.....	108
Figure 7 : Corrélation positive entre marque d’histone et niveau d’expression des gènes dans les GSC et les GSC-miR-302-367..	110
Figure Supplémentaire 2 : Détermination par qPCR des niveaux d’expression d’un sous-groupe de gènes.....	111
Figure 8 : Corrélation positive entre marque d’histone et niveau d’expression des gènes dans les GSC et les GSC-miR-302-367 en fonction de l’analyse ChiP-Seq 20kb et ChiP-Seq 2kb..	113
Figure 9 : A. Diagramme de Venn montrant les groupes de gènes présentant des marques d’histone différentes dans les GSC et les GSC-miR-302-367. Les chiffres représentent le nombre de gènes dans chaque catégorie. B. Représentation schématique des modifications de marque d’histone observées dans les GSC exprimant miR-302-367..	116

Figure 10 : Annotation fonctionnelle des changements globaux des profils de marque d'histone dans les GSC-miR-302-367 et les GSC.	117
Figure 11 : Annotation fonctionnelle des gènes présentant des marques opposées dans chaque type cellulaire. (A) Gènes passant de la marque H3K4me3 dans les GSC à la marque H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367. (B) Gènes passant de la marque H3K27me3 dans les GSC à la marque H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367.	119
Figure Supplémentaire 3 : Annotation fonctionnelle à l'aide du programme TopGO des gènes passant de la marque bivalente dans les GSC à la marque H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367 (A), des gènes passant de la marque bivalente dans les GSC à la marque H3K4me3 dans les GSC-miR-302-367 (B), des gènes passant de la marque H3K4me3 dans les GSC à la marque H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367 (C) et des gènes passant de la marque H3K27me3 à la marque H3K4me3 dans les GSC-miR-302-367 (D).	120
Figure 12 : Réseau reliant entre eux les facteurs de transcription présentant des marques d'histone différentes dans les GSC et les GSC-miR-302-367.	122
Figure 13 : Réseau de gènes associé à l'état souche et tumorigène des GSC.	124
Figure 14 : A. Association du gène ARNT2 à la marque permissive H3K4me3 dans les GSC et à la marque répressive H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367. B. Taux d'ARNm d'ARNT2 déterminés par hybridation de puces d'ADN (exon-array panneau de gauche) et RT-qPCR (panneau de droite). C. Analyse par Western blot des taux de la protéine ARNT2.	126
Figure 15 : A et B. Diminution de l'expression d'ARNT2 dans les GSC OB1 et TP84 transfectées avec des siARN anti-ARNT2. C. La réduction d'expression d'ARNT2 inhibe la croissance des GSC.	127
Figure 16 : La répression de l'expression d'ARNT2 inhibe l'expression du facteur de transcription Nanog.	128
Figure 17 : La répression de l'expression d'ARNT2 induit une diminution de l'activité des gènes rapporteurs HIF1a (A) et Nanog (B) mais est sans effet sur celle du gène rapporteur Sox2 (C). ..	129

Tableaux

Introduction. Chapitre 1 : Les gliomes

Tableau 1. Classification des gliomes selon OMS.	29
Tableau 2. Travaux pionniers de la découverte des CSC dans les tumeurs solides.	40

Chapitre 2 : Epigénétique

Tableau 1 : Différentes classes de modifications des histones.....	51
Tableau 2 : Lysine méthyltransférases (KMT) humaines et leur substrat.....	56
Tableau 3 : Lysine déméthylases (KDM) humaines et leur substrat.....	58
Tableau 4 : Rôle des composants de PRC1 et PRC2 (Aloia et al., 2013).....	63
Tableau 5 : Dérégulation de H3K4me3 et H3K27me3 associée au développement du cancer..	69

Matériels et Méthodes

Tableau 1: Liste des produits biochimiques utilisés.....	75
Tableau 2: Liste des anticorps, siRNA et plasmides utilisés.....	78
Tableau 3: Liste des cultures de GSC utilisées.....	80

Abréviations

2HG : 2-Hydroxyglutarate

2-OG : α -cétoglutarate ou 2-oxoglutarate

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADP : Adénosine Diphosphate

AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNT1 : Aryl-hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator 1 connu aussi comme HIF1- β

ARNT2 : Aryl-hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator 2 connu aussi comme HIF2- β

ASCL1 : Achaete-Scute family bHLH transcription factor 1

ATP : Adénosine Triphosphate

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor

bHLH-PAS : basic Helix Loop Helix with PAS domain

CHI3L1 : Chitinase-3-like protein 1

ChIP-sequencing ou **ChIP-seq** : Immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage

CL : Classical

CSC : Cellule Souche Cancéreuse ou « Cancer Stem Cell »

CTNNB1 : Catenin (cadherin-associated protein), beta 1 connu aussi comme β -catenin

DAVID : Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery

DKK1 : Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1

DOT1L : Disruptor Of Telomeric silencing 1 Like

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EPAS1 : endothelial PAS domain protein 1 connu aussi comme HIF-2 α

Esc : Extra sex combs

ESC : Embryonic Stem Cells

E(z) : zeste d'enhancer

EZH2 : enhancer of zeste homolog 2

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FOXA2 : Forkhead box A2

FOXO3 : Forkhead box O3

Fz : Frizzled

G-CIMP+ : CpG island methylator phenotype (CIMP) in gliomas

GABA : Gamma-Amino Butyric Acid

GBM : glioblastomes

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GIDP : Gliome Intrinsèque Diffus du Pont

GLI : Glioma associated oncogene

GO : Gene ontology

H3F3A : H3 histone, Family 3A

H3K4me1 ou me2 ou me3 : lysine 4 de l'histone H3 monométhylée ou di-méthylée ou tri-méthylée

H3K27me1 ou me2 ou me3 : lysine 27 de l'histone H3 monométhylée ou di-méthylée ou tri-méthylée

H3S10 : Sérine en position 10 sur l'histone H3

HAT : Histone Acetyltransférase

HDAC : Histone Déacétylase

HIF1- α : Hypoxia Inducible Factor-1 α

HIF2- α : Hypoxia Inducible Factor-2 α connu aussi comme EPAS1

HIF1- β : Hypoxia Inducible Factor-1 β connu aussi comme ARNT1

HIF2-β : Hypoxia Inducible Factor-2β connu aussi comme ARNT2

IDH1: Isocytate dehydrogenase 1

IGV : Illumina genome viewer

ING : inhibitor of growth

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

JARID1 : Jumonji AT-Rich Interactive Domain 1

JHDM1B : Jumonji C domain-containing Histone Demethylase 1B

JmjC : jumonji

JMJD3 : Jumonji Domain-Containing Protein 3 connu aussi comme KDM6B

K4DM : déméthylase spécifique de la Lysine 4

K27DM : déméthylase spécifique de la Lysine 27

KDMs : Lysines déméthylases

KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

KMTs : Lysines méthyltransférases

LEF1 : Lymphoid Enhancer-binding Factor 1

LOH : Loss of Heterozygosity

LRP : Low-Density Lipoprotein Related Protein

LSD1 : Lysine-Specific Demethylase 1

MAP : Microtubule-associated proteins

MAPK : Mitogen Activated Protein kinase

MES : Mésoenchymateux

MET : Mesenchymal-Epithelial Transition factor

MGMT : O6 méthyl-guanine méthyl-transférase

miR : micro-ARN

MLL : Mixed Lineage Leukemia

NEU : Neural

NF1 : Neurofibromatose 1

NHA : astrocytes normaux humaines

NOD/SCID : Non Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient

NPAS4 : Neuronal PAS 4

NSC : Neural Stem Cell

Oct-4 : Octamer-binding transcription factor-4

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

p14ARF : proteine 14 Alternative Reading Frame

p53 : Protéine 53

PcG : Polycomb group

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PH : Polyhomeotic

PHD : Plant Homeo Domain

PHF23 : PHD finger protein 23

PI3K : Phosphoinositide-3-Kinase

PN : Proneural

PPARG : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma

PRC1 : Polycomb Repressive Complex 1

PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2

PSC : posterior sex comb

PTEN : Phosphatase and Tensin homologue

Pygo : Pygopus

RAS : Rat Sarcoma

RB : Retinoblastome

RBP2 : Retinol Binding Protein 2

RT-qPCR : Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction

Shh : Sonic Hedgehog

SNC : Système Nerveux Central

SAM : S-adénosyl-L-méthionine

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SIM1-2 : Single Minded 1-2

SIRT2 : Sirtuin 2

SOX2 : Sex determining region Y Box 2

STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

STRING : Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins

Su(z)12 : supprimeur de zeste 12

TBP : TATA Box-binding Protein

TCF : T cell factor

TET2 : Ten-Eleven Translocation 2

TGF α : Transforming Growth Factor α

TGNM : Tumeurs Glio-Neurales Malignes

TMZ : Temozolomide

TopGO : Topology of Gene Ontology

TP53 : tumor protein p53

TrxG : groupe Trithorax

TSS : Transcription Start Site

UTX : Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome, connu aussi comme KDM6A

UV : Ultraviolet

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Wnt : wingless integration site

YKL-40 : Tyrosine, Lysine, Leucine-40 kilo Dalton, connu aussi comme CHI3L1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les gliomes

1.1. Généralités

Le système nerveux central est composé de plusieurs types cellulaires dont l'origine est soit le neuroépithélium (neurones et cellules gliales) soit l'endothélium (environ 100km de microvaisseaux dans un cerveau humain) soit le système immunitaire périphérique (cellules microgliales). Longtemps il a été avancé que la proportion entre neurones et cellules gliales étaient très variables au cours de l'évolution du règne animal : 10 neurones pour une glie chez les invertébrés, 1/1 chez les poissons et un neurone pour dix cellules gliales dans le cerveau des mammifères en général et chez l'homme en particulier. Les travaux récents du groupe de Roberto lent ont réévalué ces chiffres et la proportion semble plus proche du 1/1 chez les mammifères, avec une tendance à la perte neuronale au cours du vieillissement ce qui a conduit à certaines affabulations telle celle selon laquelle l'intelligence d'Albert Einstein (1879-1955) aurait été associée à une proportion de cellules gliales incroyablement élevée (« *La clé du génie d'Einstein ?* », *Science et Vie*, novembre 2005, page 71.).

L'environnement des neurones est formé par les cellules gliales (du grec γλία (glia), « la colle ») qui sont constituées de deux grandes familles : la macroglie (astrocytes, oligodendrocytes et épendymocytes) et la microglie (**Figure 1**). Occupant environ 50% du volume du SNC (Système nerveux central), ces cellules participent au maintien de l'homéostasie et soutiennent le tissu nerveux en leur apportant les nutriments et l'oxygène nécessaires. Les cellules gliales assurent de nombreuses fonctions essentielles depuis la protection du SNC jusqu'à l'intégration du signal nerveux.

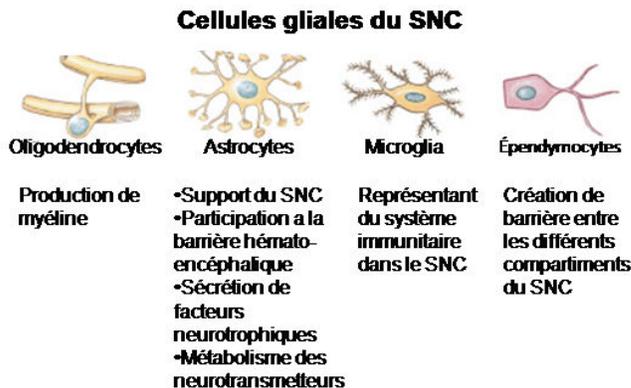


Figure 1 : Rôle des cellules gliales dans le système nerveux.

Les gliomes sont les tumeurs primaires les plus fréquentes du SNC qui touchent aussi bien les adultes que les enfants. Leurs noms proviennent des ressemblances morphologiques des cellules tumorales avec les cellules macrogliales du SNC, d'où les termes astrocytome (astrocytes), oligodendrogliomes (oligodendrocytes) et épendymomes (épendymocytes) (*Louis et al., 2007*). Ce sont des tumeurs très agressives dans leurs formes de haut grade, hélas les plus fréquentes, qui font partie actuellement des cancers dont la mortalité et la morbidité sont les plus élevées (*Ohgaki H and Kleihues P, 2007*). Elles sont hautement hétérogènes et infiltrantes ce qui leur permet d'envahir le tissu normal environnant (*Claes A et al., 2007*). Par contre elles induisent très rarement des métastases en dehors du SNC (*Kalokhe G et al., 2012*).

Les gliomes sont uniques par rapport au reste des tumeurs solides à cause de leur influence sur le comportement des patients. Selon la location de la tumeur dans le SNC, on distingue deux grands types de symptômes qui sont dus aux gliomes : ceux liés à une augmentation de la pression intra-crânienne conduisant à des maux de tête, des migraines, des nausées, des vomissements, des troubles de parole, un déficit visuel, et ceux témoignant d'une irritation ou d'une destruction parenchymateuse entraînant respectivement des crises d'épilepsie focales ou des déficits neurologiques focaux. Les gliomes peuvent également provoquer des dysfonctionnements cognitifs illustrés par des modifications de la personnalité ou de l'humeur, ou des pertes de mémoire (*Behin et al., 2003*).

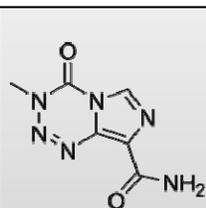
L'incidence des gliomes, qui varie selon le sexe, l'âge et la géographie, est d'environ 5 à 10 cas par an pour 100,000 dans la population générale (*Ohgaki et al., 2010*). Des facteurs environnementaux et/ou génétiques augmentent la probabilité de certaines populations de développer un gliome (*Ohgaki et al., 2010*). Bien que la majorité des gliomes soit sporadique, d'origine inconnue, certaines prédispositions génétiques, trouvées dans des familles atteintes de syndromes tumorales rares, constituent un terrain favorable à leur développement (*Ohgaki et al., 2010*).

Les traitements actuels des gliomes permettent de prolonger la survie des patients mais aucun traitement curatif n'existe. Un des principaux obstacles au traitement de ces tumeurs, réside dans leur nature hautement invasive, rendant l'exérèse chirurgicale totale impossible. En principe, la chirurgie est suivie d'un traitement de radiothérapie et/ou chimiothérapie ciblant les cellules en division afin de créer des anomalies dans leur ADN ce qui aboutirait à la mort des cellules (*Abrey et Mason, 2003*). Cependant, vue la faible activité mitotique des gliomes, l'efficacité de ces approches reste limitée. Enfin, l'accessibilité des drogues cytotoxiques aux

cellules tumorales isolées au sein du parenchyme est limitée par la présence de la barrière hémato-encéphalique. La principale drogue utilisée pour le traitement des gliomes de haut grade est connue sous le nom « témozolomide » (**Box1**).

Afin de pouvoir soigner d'une manière efficace les gliomes, il est impératif de mieux comprendre l'étiologie, le développement et le comportement de ces tumeurs. Une des premières approches permettant de clarifier et de comprendre la biologie des gliomes fut l'établissement d'une classification servant de cadre international à leur analyse.

Box 1.



Le temozolomide (TMZ) méthyle l'oxygène en position 6 des bases guanines induisant une cytotoxicité et une mort cellulaire par apoptose (Ochs et Kaina, 2000 CT). L'enzyme MGMT (O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase) est capable de s'opposer aux effets du TMZ en transférant le groupe de méthyle apposé par ce dernier. Presque la moitié des patients atteints de gliomes présente une sous-expression de MGMT dû à la méthylation de son promoteur. En bon accord, les taux d'expression de cette enzyme qui dépend du statut de méthylation du promoteur de son gène peuvent avoir une valeur prédictive dans le traitement des gliomes le profil hyper méthylé ou G_CIMP+ étant de meilleur pronostic (*Esteller et al., 2000*).

1.2. Classification des gliomes

1.2.1. Classification selon les critères histologiques

Le classement des gliomes en différents sous-groupes est établi par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et régulièrement actualisé en fonction des avancées scientifiques (*Louis DN et al., 2007*). Malgré la large utilisation de la classification de l'OMS, celle-ci fait l'objet de controverses puisqu'elle est basée sur des observations histologiques, le type histologique étant défini en fonction de la ressemblance morphologique au type cytologique prédominant, donc largement basé sur l'évaluation subjective de l'examineur comme démontré par les grandes différences de diagnostics répétés tant en intra-observateur qu'en inter-observateur : plus de 30% de variabilité. Comme dit auparavant, les gliomes dont les cellules tumorales ressemblent à des astrocytes sont classés en astrocytomes, ceux dont les cellules tumorales ressemblent à des oligodendrocytes en oligodendrogliomes, alors que les tumeurs qui

présentent un mélange de cellules ressemblant à l'un ou l'autre type cellulaire sont connues comme oligoastrocytomes. La classification en différents grade de malignité est basée selon la présence ou non de quatre différents critères histologiques (atypie nucléaire, activité mitotique, prolifération vasculaire et nécrose) (**Tableau 1, Figure 2**). L'acquisition successive et ordonnée de ces critères fait évoluer le degré de malignité de la tumeur du grade I (bénin), regroupant les tumeurs à croissance lente, au grade IV (malin), regroupant celles à croissance rapide. La classification OMS distingue les gliomes bénins et malins de bas grade (I et II, respectivement) et les gliomes malins de haut grade (III et IV) (*Frenel JS et al., 2009*). Les gliomes de grade I regroupent les astrocytomes pilocytiques qui évoluent rarement vers des formes de plus haut grade. Leur guérison est obtenue après exérèse chirurgicale complète (*Louis DN et al., 2007*). Les gliomes de grade II sont constitués d'astrocytomes, d'oligodendrogliomes et d'oligoastrocytomes. Ce sont des tumeurs infiltrantes à croissance lente. Contrairement aux astrocytomes pilocytiques, 70% des astrocytomes de grade II évoluent vers des hauts grades (*Papagikos et al., 2005*).

Tableau 1. Classification des gliomes selon l'OMS

Grade selon OMS	Nomenclature selon OMS	Critères histologiques
I	Astrocytomes pilocytiques	-
II	Astrocytomes, oligodendrogliomes et oligoastrocytomes diffus	1 critère : souvent atypie nucléaire
III	Astrocytomes, oligodendrogliomes et oligoastrocytomes anaplasiques	2 critères : atypie nucléaire et activité mitotique
IV	Glioblastomes	3 critères : atypie nucléaire, activité mitotique, prolifération vasculaire et/ou nécrose

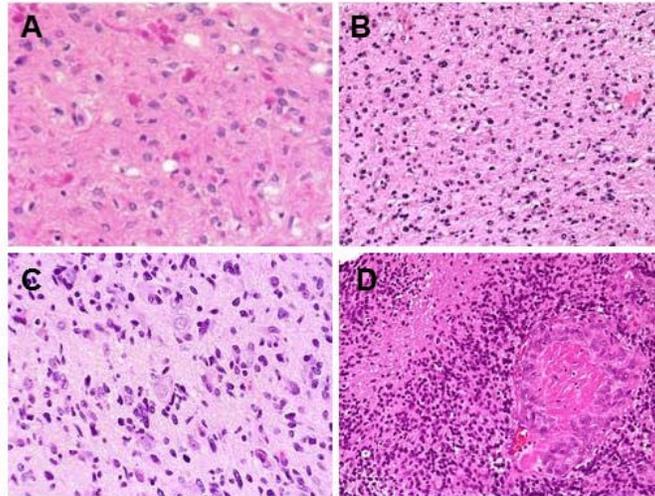


Figure 2 : Histologie des astrocytomes selon l'OMS. La coloration utilisée permet de distinguer le cytoplasme des cellules en rose et le noyau en violet. **A.** Astocytome pilocytique (grade I). **B.** Astrocytome diffus (grade II). **C.** Astrocytome anaplasique (grade III). **D.** Glioblastome (grade IV) (<http://www.cnsatlas.com>).

Le terme d'anaplasie désignant la dédifférenciation, est appliqué aux gliomes de plus forte malignité (grade III) qui regroupent les astrocytomes anaplasiques, les oligodendrogliomes anaplasiques et les oligoastrocytomes anaplasiques. Enfin, les gliomes de très forte malignité correspondent aux glioblastomes (GBM), également nommés astrocytomes de grade IV (**Figure 3**). Selon leurs profils biologiques et génétiques, les GBM sont distingués en deux types : primaires et secondaires. Les glioblastomes primaires ou *de novo* représentent 90% de la totalité des glioblastomes (*Kanu OO et al., 2009*), alors que les glioblastomes secondaires sont des gliomes de stade II ou III ayant évolué en gliomes de stade IV. Malgré leur similarité histologique et pronostique, les deux types de glioblastomes correspondent à des entités moléculaires différentes (*Maher EA et al., 2006*) (**Figure 4**).

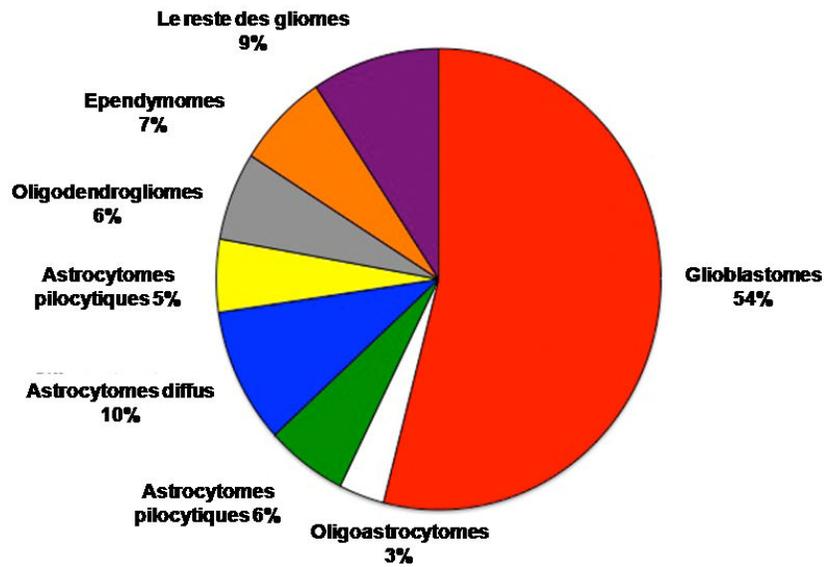


Figure 3 : Distribution des gliomes. Les GBM représentent 54% de tous les sous-types des gliomes (Adapté de *Dolecek et al., 2012*).

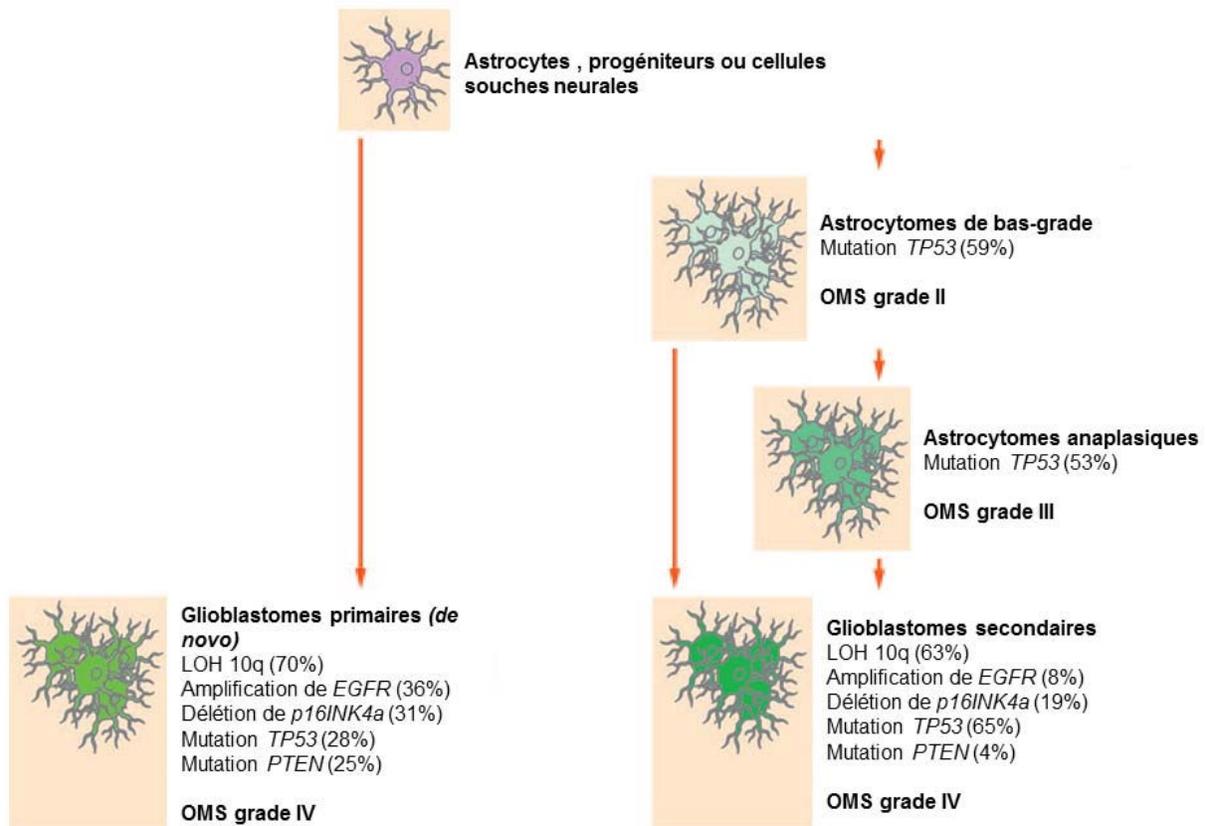
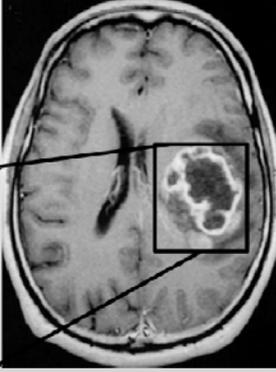


Figure 4 : Principales altérations génétiques des glioblastomes primaires versus les glioblastomes secondaires (*Ohgaki and Kleihues, 2007*).

Bien que la classification de l'OMS soit universellement utilisée, la reproductibilité des diagnostics fondés sur elle reste problématique. En effet, une discordance dans le diagnostic d'une même préparation entre 4 neuropathologistes différents et d'un même observateur entre 2 observations à des moments différents indique que la classification de l'OMS semble loin d'être satisfaisante (*Mittler MA et al., 1996 ; Brat et al., 2008*).

Une alternative de classification des gliomes a été proposée par le Pr Catherine Daumas-Duport de l'hôpital Sainte-Anne (Paris, France) basée sur une intégration des données de la clinique (en particulier l'âge du patient, la chronologie des symptômes et la présence ou l'absence de signes neurologiques) et surtout des données radiologiques (principalement celle de l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) dans l'étude histologique des tumeurs (*Daumas-Duport C et al., 2000; Varlet P et al., 2005*). L'utilisation de ces critères a conduit à une simplification de la classification de l'OMS. En effet la classification de Sainte-Anne ne reconnaît que trois catégories tumorales. Les oligodendrogliomes et les oligo-astrocytomes de grade A (absence d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste) ou de grade B (présence d'hyperplasie endothéliale et/ou prise de contraste), les glioblastomes et les tumeurs glioneuronales malignes (TGNM) (un sous-groupe particulier de tumeurs malignes, caractérisé par une double différenciation gliale et neuronale) (**Box 2**).

Box 2.

Classification OMS	Classification Sainte-Anne	
Astrocytome Astrocytome anaplasique Oligodendrogliome	Oligodendrogliome A	
Oligodendrogliome Oligodendrogliome anaplasique	Oligodendrogliome B	
Astrocytome Astrocytome anaplasique Glioblastome	Glioblastome	

Correspondance entre la classification OMS et Sainte-Anne. Le tissu tumoral fortement vascularisé apparaît sous forme d'un anneau blanc sur l'image scannographique avec injection de produit de contraste. L'oligodendrogliome de la classification OMS est considéré, dans la classification Sainte-Anne, de type A lorsqu'il y a absence d'hyperplasie endothéliale et de type B lorsqu'il y a présence d'hyperplasie endothéliale. L'imagerie cérébrale provient de la collection iconographique du laboratoire d'anatomo-pathologie de l'hôpital Sainte-Anne de Paris.

1.2.2. La génétique des gliomes

Les principales altérations reconnues au cours du développement des gliomes concernent la dérégulation des cascades de signalisations initiées par les facteurs de croissance PDGF et EGF, qui affecte la prolifération, la différenciation, la survie et la migration des cellules tumorales (Konopka G and Bonni A, 2003) PDGF et EGF agissent par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires à activité tyrosine-kinase (RTK) (Figure 3). EGFR et PDGFR, activent la cascade RAS/MAPK (Mitogen Activated Protein kinase) ainsi que la voie PI3K/Akt (Phosphatidylinositol 3-kinase) (Fan QW and Weiss WA, 2010). Ainsi, la surexpression du gène codant pour l'EGFR induit une augmentation de l'agressivité tumorale par réduction de l'apoptose et stimulation de la prolifération cellulaire dans les gliomes (Gladson CL et al, 2010). Cette surexpression est presque toujours associée à une amplification du gène localisé sur le chromosome 7p12, et dont 40% de ces cas présentent une mutation correspondant à la délétion des exons 2 à 7 produisant le variant III (EGFRvIII) qui rend le récepteur constitutivement actif.

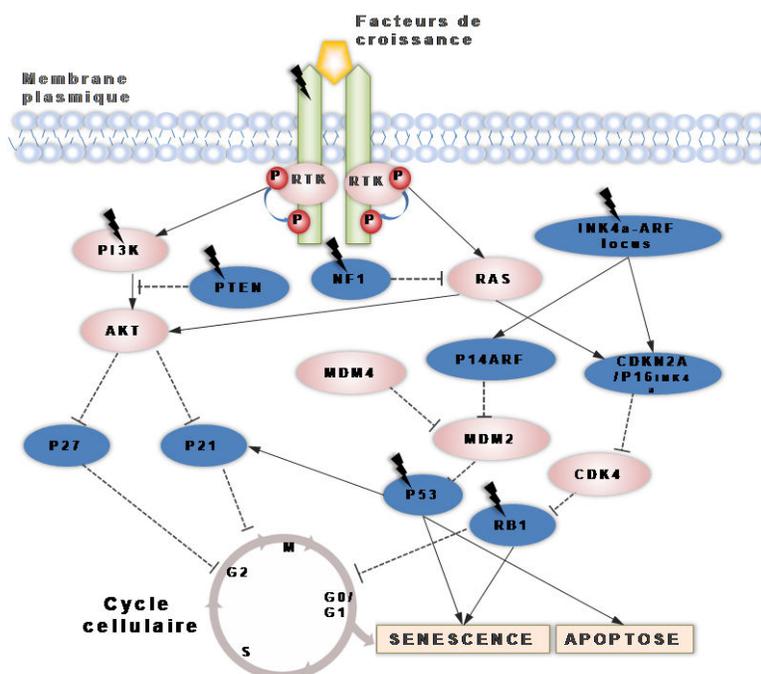


Figure 5 : Représentation schématique des voies de signalisation les plus dérégulées dans les gliomes humains. En bleu, les suppresseurs de tumeurs (sous-exprimés dans divers cancers), en rose les oncogènes (surexprimés dans de nombreux cancers). Les gènes trouvés mutés dans les glioblastomes humains sont indiqués avec un symbole en forme d'éclair.

Des mutations dans les gènes qui contrôlent l'activité des voies de transduction RAS/MAPK et PI3K/Akt peuvent également être responsable de la sur-activation de ces voies. C'est le cas de la mutation perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *PTEN* (Phosphatase and Tensin homologue) qui entraîne une suppression du contrôle de la voie AKT ce qui induit une acquisition d'un phénotype invasif (*Furukawa K et al., 2006*) et une résistance à l'apoptose (*Thomas SL et al., 2010*). De même *NF1* dont l'inactivation fonctionnelle conduit à une sur-activation des deux voies RAS/MAPK (*Dasgupta B et al., 2005; Zhu Y et al., 2005; Brennan C et al., 2009*) et PI3K/Akt (*Lau N et al., 2000*).

En plus de la voie EGFR/PTEN/PI3K/AKT, les voies TP53/MDM2/P14ARF et p16/RB/CDK4 sont fréquemment altérées. La résultante de ces combinaisons de dérégulation conduit vers une plus grande malignité (*Chow LM et al., 2011*). En particulier, *p53* et *RB* sont des gènes suppresseurs de tumeur qui régulent la prolifération cellulaire. *TP53* doit être activée et *RB* inactivée pour que la cellule en prolifération passe de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. L'inactivation de *p53* provoque des divisions cellulaires anormales et entraîne une instabilité génomique facilitant l'accumulation d'autres mutations, qui permet ainsi une progression vers une plus grande malignité (*Ichimura K et al., 2000; Maher EA et al., 2001*).

1.2.3. Profils transcriptomiques des glioblastomes

La classification histopathologique de l'OMS ne rend pas compte du comportement biologique différent de gliomes classés dans le même groupe histopathologique, ni des variations énormes des taux de survie des patients correspondants, ce qui suggère l'existence d'une complexité moléculaire qui dépasse cette classification (*Brat et al., 2008*).

Une analyse transcriptomique à grande échelle des gliomes humains a permis d'améliorer la classification clinique de ces tumeurs. Cette approche a abouti à l'identification de profils moléculaires correspondant à des tumeurs qui diffèrent nettement en termes de survie des patients (*Vitucci et al, 2011*) et qui répondent différemment aux thérapies (*Verhaak et al, 2010*) (**Figure 4**). En prenant en considération que le nombre et le type de sous-classes peuvent différer en fonction de la cohorte analysée et la technique utilisée, deux études complémentaires (*Phillips et al, 2006; Verhaak et al, 2010*) identifient deux sous-types aux caractéristiques extrêmes en terme de survie et de profil moléculaire Proneural (PN) et Mésoenchymateux (MES).

La marque distinctive du sous-type Proneural est la mutation identifiée récemment sur le gène *IDH1*. La plus fréquente de ces mutations de l'enzyme est *IDH1-R132H* (*Losman and Kaelin 2013*), qui aboutit à l'accumulation de (R)-2HG (2-hydroxyglutarate) dans les cellules. Entre autres, les niveaux élevés de 2HG altèrent l'activité de nombreuses enzymes dépendantes du 2OG (2-oxoglutarate), puisque qu'ayant une structure similaire au 2OG, le 2HG peut inhiber par compétition la fonction de ces enzymes. Les gliomes portant la mutation *IDH1* ont un profil d'ADN hyperméthylé et ce sous-groupe est connu comme les G-CIMP+ (« CpG island methylator phenotype »). A noter également que les amplifications de *PDGFRA* et de *MET* avec la perte d'hétérozygotie (LOH ou lost of heterozygosity) ou les mutations de *p53* sont associées au sous-groupe Proneural. Les patients diagnostiqués avec un gliome de profil Proneural ont une meilleure survie que les autres sous-types. D'un autre côté, le sous-groupe MES, où *IDH1* n'est pas muté, présente fréquemment une LOH ou une mutation sur le gène *NF1*. L'inhibition de *NF1* peut affecter plusieurs voies comme *YKL-40* et *VEGF*. Il est notable que le facteur de transcription *STAT3* est le majeur régulateur de ce sous-type. Les patients diagnostiqués avec le sous-groupe MES ont une survie réduite.

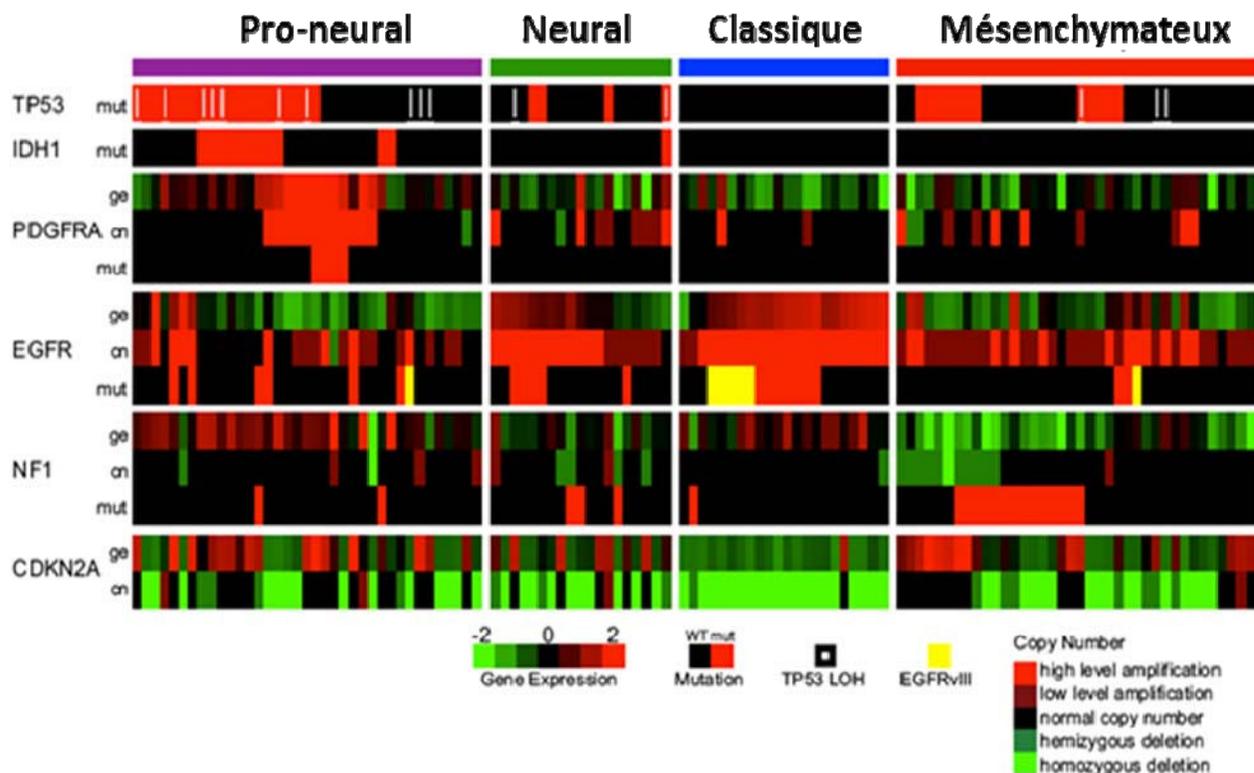


Figure 6 : Profils transcriptomiques et altérations génomiques identifiant des sous-types de glioblastomes (de Verhaak et al., 2010). ge : gene expression, cn : copie number, mut : mutation ; TP53 : tumor protein p53, IDH1: Isocytate dehydrogenase 1, PDGFRA : platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide, EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor, NF1 : Neurofibromine 1, CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A.

A ces deux sous-types maintenant relativement bien-définis, différentes équipes en ont identifié d'autres avec un profil moléculaire distinct. Phillips et al. (Phillips et al., 2006) ont rapporté un sous-type prolifératif, qui a un fort index MIB-1. Verhaak et al. (Verhaak et al., 2010) décrit les sous-types Classical (CL) et Neural (NEU). Le sous-groupe CL est corrélé avec une voie de signalisation EGFR aberrante, alors que le sous-groupe NEU n'est caractérisé par aucune altération génomique spécifique qui le distinguerait des autres sous-types et clusterise en transcriptome entre MES et PN.

Ces classifications buttent toutefois sur l'hétérogénéité et la polyclonalité des tumeurs, d'où un intérêt qui reste à établir. En effet, les gliomes sont connus comme des tumeurs très hétérogènes et donc les profils transcriptomiques représentent majoritairement la ou les sous-

population(s) dominante(s). Par contre, les populations minoritaires, telles que les cellules souches cancéreuses (CSC), ne sont pas représentées dans le profil transcriptomique.

1.2.4. Comparaison des gliomes adultes et des gliomes enfants

La fréquence, la localisation anatomique et l'évolution clinique des gliomes diffèrent entre enfants et adultes. Les gliomes de bas grade prédominent chez l'enfant contrairement aux gliomes de l'adulte où les formes les plus agressives et malignes sont les plus fréquentes (glioblastomes).

On retrouve chez l'enfant, dans les gliomes de bas grade, les tumeurs astrocytaires, oligodendrogiales et les tumeurs mixtes neuro-gliales (*Sievert AJ and Fisher MJ, 2009*). Les astrocytomes pilocytiques (grade I) sont les plus fréquents (*Pfister S and Witt O, 2009*). Ces tumeurs permettent souvent une exérèse complète et la guérison car elles sont généralement bien limitées.

Contrairement à l'adulte où les tumeurs de bas grade évoluent pour la plupart, en formes de haut grade, chez les enfants ce phénomène est rare (*Broniscer et al., 2007*), les tumeurs de haut grade apparaissant le plus souvent *de novo*. Ces gliomes de haut grade sont dévastateurs mais demeurent biologiquement mal connus (*Bax DA et al., 2009b*). Sur le plan histologique, la majorité de ces tumeurs sont soit des astrocytomes anaplasiques, soit des glioblastomes selon leur grade de malignité. Les tumeurs mixtes ou à composante oligodendrogiale ne sont observées que très rarement chez l'enfant (*Broniscer A and Gajjar A., 2004*). Ces tumeurs apparaissent chez les enfants à différents âges et siègent particulièrement au niveau des zones sus-tentorielles, du thalamus et du tronc cérébral.

Une autre différence majeure observée concerne les anomalies génétiques. Bien que les mutations de *TP53*, *CDKN2A* et *PI3KCA* soient communes dans les gliomes de haut grade chez l'enfant et l'adulte, chez l'enfant, les mutations de *PTEN* et les amplifications du gène *EGFR* sont peu courantes (*Pollack et al., 2001 ; Newcomb et al., 2000*). Par contre, *PDGFRA* a récemment été largement impliqué dans une étude ayant établi un profil moléculaire des tumeurs de haut grade de l'enfant, et l'absence de la mutation du gène *IDH1* dans les tumeurs pédiatriques a été confirmée (*Paugh et al., 2010*). Inversement, la mutation H3F3A se retrouve uniquement dans les gliomes pédiatriques (*Wu G et al., 2012 ; Schwartzenuber J et al., 2012*).

Les thérapies standard appliquées aux tumeurs pédiatriques de haut grade sont identiques à l'adulte et peu efficaces, probablement car elles ne prennent pas en considération les différences biologiques entre les deux types de tumeurs (Hargrave, 2009).

1.3. Les cellules souches cancéreuses

Actuellement, il existe deux modèles différents, le stochastique et le hiérarchique, qui récapitule comment le développement d'une tumeur s'effectue. Le modèle stochastique, dominant depuis nombreuses années, soutient que toutes les cellules cancéreuses d'une tumeur possèdent le même potentiel intrinsèque pour générer une nouvelle tumeur.

Récemment, la découverte d'une sous-population de cellules, au sein d'une masse tumorale hétérogène, possédant des propriétés souches, telles que l'auto-renouvellement et la clonalité, et seules capables d'initier la formation de tumeur, a fait émerger un nouveau modèle, le modèle hiérarchique. Vu la similarité des propriétés de cette sous-population tumorale avec les cellules souches normales, cette première est nommée «cellules souches cancéreuses (CSC)» (Box 3, Figure 5).

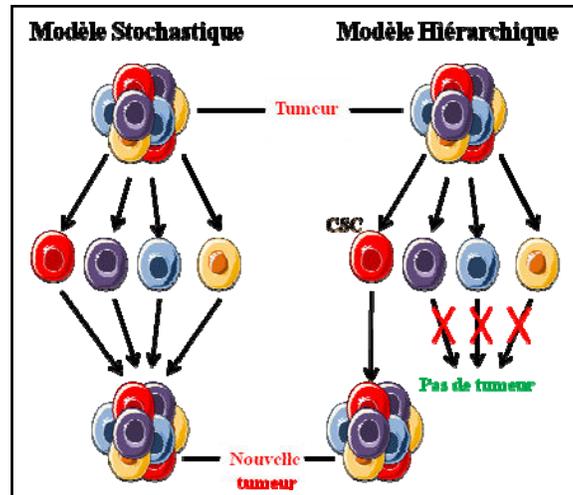


Figure 7 : Modèles hypothétiques de la tumorigenèse. Le modèle stochastique stipule que la transformation maligne est un processus aléatoire auquel toutes les cellules peuvent contribuer. Le modèle hiérarchique suggère que seules les GSC sont capables d'initier la formation d'une tumeur. (Adaptée à partir de Tataria M et al., 2006).

Box 3.

Les cellules souches embryonnaires (ESC, pour Embryonic Stem cells) sont dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste. Ces cellules sont pluripotentes, elles ont la capacité de former tous les tissus de l'organisme.

Les cellules souches adultes sont présentes dans plusieurs tissus et sont, pour la plupart, déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique, ce qui explique leur hétérogénéité. Même si certaines d'entre elles peuvent conduire à la formation ou à la régénération de tissus distincts (multipotence), elles ne sont pas comme leurs homologues embryonnaires, pluripotentes.

L'étude pionnière qui discute de la présence d'une sous-population de cellules souches cancéreuses (CSC) dans les leucémies fut réalisée par l'équipe de John Dick en 1994 (*Bonnet D and Dick JE, 1997*). D'après leurs résultats, seules les cellules CD34+/CD38- (**Box 4**) étaient capables de générer l'ensemble des différents types de cellules tumorales présentes dans la leucémie originale, une fois greffée chez des souris immunodéficientes NOD/SCID (Non Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient).

Box 4.

CD34 (Cluster Differentiation 34) : marqueur présent à la surface d'une population de la moelle osseuse incluant les progéniteurs et les cellules hématopoïétiques immatures (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD34>).

CD38 (Cluster Differentiation 34) : marqueur de différenciation présent à la surface des cellules lymphocytaires et myéloïdes (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD38>).

Le **tableau 2** récapitule l'ensemble des études initiales décrivant l'identification de CSC dans plusieurs tumeurs solides.

Aucun marqueur spécifique aux CSC dérivées de tumeur solide n'a été décrit jusqu'à présent (*Rochon C. et al., 2006*). En conséquence, la seule façon de caractériser des CSC est d'étudier leurs propriétés d'auto-renouvellement et leurs capacités de différenciation *in vitro*, mais aussi par leur capacité à former des tumeurs présentant les caractéristiques de la tumeur d'origine après transplantation.

Les propriétés des CSC sont :

1.3.1 Auto-renouvellement

L'auto-renouvellement se définit par la capacité des cellules souches à se reproduire indéfiniment tout en gardant leur état indifférencié. Cette notion implique qu'une cellule souche doit être capable, après mitose soit symétrique soit asymétrique, de générer au moins une cellule identique à elle-même et donc de conserver les mêmes propriétés (*Fuchs E and Chen T, 2013*) (**Figure 8**).

Tableau 2. Travaux pionniers de la découverte des CSC dans les tumeurs solides

Tumeurs solides	Références
Tumeurs cérébrales	Singh SK et al., 2004
Cancer du sein	Al-Hajj M et al., 2003; Wicha MS, 2006
Cancer du côlon	Ricci-Vitiani L et al., 2007; O'Brien CA et al., 2007
Cancer pancréas	Li C et al., 2007
Cancer de l'ovaire	Szotek PP et al., 2006; Zhang S et al., 2008
Cancer du foie	Suetsugu A et al., 2006
Cancer de la prostate	Collins AT et al., 2005
Cancer du poumon	Eramo A et al., 2008

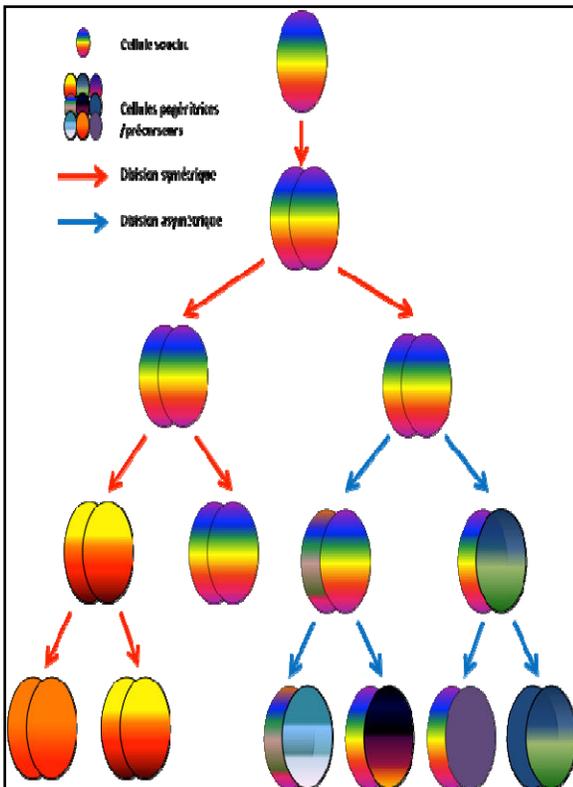


Figure 8 : Propriété des CSC : auto-renouvellement symétrique et asymétrique.

Dans une division symétrique, la cellule souche mère génère deux cellules filles parfaitement identiques et équivalentes, possédant les mêmes potentialités que la cellule mère. Dans une division asymétrique, les cellules filles ne sont ni identiques ni équivalentes entre elles. Une des cellules filles sera identique et équivalente à la cellule mère, tandis que l'autre entamera le processus de différenciation. Cellules progénitrices : cellules souches multipotentes. Précurseurs : cellules déjà engagées dans une voie de différenciation. (Adaptée à partir de Snippert HJ and Clevers H, 2011 et Fuchs E, Chen T, 2013).

1.3.2. Clonalité

La clonalité se traduit par la capacité d'une cellule individuelle souche à se diviser pour générer, à l'identique, plusieurs cellules souches qu'on appelle clone (une sphère). (Snippert HJ and Clevers H, 2011).

1.3.3. Expression de marqueurs de cellules souches

La régulation et le maintien des propriétés souches des CSC, comme pour les cellules souches normales, est définie par la présence de plusieurs facteurs de transcription commun qui assure le contrôle des gènes qui régulent l'auto-renouvellement et la différenciation. Les facteurs de transcription Oct-4 (Octamer-binding transcription factor-4), SOX2 (Sex determining region Y Box 2) et Nanog forment le réseau de base de cette régulation (Snippert HJ and Clevers H, 2011; Wang Z et al., 2012).

Dans des conditions normales, Oct-4, SOX2 et Nanog forment un réseau dont le rôle est celui de régulateurs essentiels du développement précoce, caractéristiques des cellules souches embryonnaires (Lin Y et al., 2012). La présence de ces facteurs de transcription est indispensable au stade blastocyttaire (Keramari M et al., 2010; Wang Z et al., 2012).

L'expression de Oct-4 est réprimé au cours des stades initiaux de la différenciation (*Wang Z et al., 2012; Tsai CC et al., 2012*) et ses taux d'expression sont régulés par le facteur de transcription SOX2 (*Masui et al., 2007*). Des expériences, *in vitro*, ont permis de montrer que l'interaction Oct4-SOX2 agit en synergie directement sur le promoteur de Nanog ce qui permet le déclenchement de sa transcription (*Rodda DJ et al., 2005*) et le maintien ainsi de l'état indifférencié des cellules (*Loh YH et al., 2006; Zbinden M et al., 2012; Fareh M et al., 2012*).

1.3.4. Initiation de la formation des tumeurs : propriétés tumorigènes

La propriété la plus importante des CSC qui les distingue des cellules souches normales est leur capacité à initier la formation, *in vivo*, d'une tumeur mimant les caractéristiques de la tumeur d'origine (phénocopie) après transplantation (*Snippert HJ and Clevers H, 2011*).

1.4. Origine cellulaire des gliomes

L'origine des gliomes est très controversée et deux théories s'opposent actuellement. L'une soutient que les gliomes sont issus de cellules gliales dédifférenciées et l'autre des cellules souches neurales normales. Il ne faut pas confondre la notion de cellules initiatrices de tumeur (TIC) (synonyme de cellules souches cancéreuses) avec la cellule à l'origine de la tumeur. En effet, les TIC sont nommées ainsi pour leur capacité à générer des tumeurs après xénotransplantation. Donc ces cellules ne sont pas obligatoirement les cellules qui initient la tumeur.

1.4.1. *in vitro*

La première théorie met en avant les caractéristiques morphogénétiques que partagent les cellules gliales aux gliomes, d'où l'origine de leur nom. De plus, les cellules gliales, en réponse à des modifications épigénétiques, sont capables de se dédifférencier. Sharif et ses collaborateurs ont montré que les astrocytes de souris, lorsqu'ils sont traités en continu plus de 7 jours avec le facteur de croissance TGF α (Transforming Growth Factor α), peuvent réacquérir le phénotype glial radiaire ou souche neurale (*Sharif A et al., 2006*). Les cellules ainsi traitées ne sont pas capables de former une tumeur mais elles sont sensibilisées à la transformation maligne induite par un stress génotoxique telle qu'une irradiation γ .

La seconde théorie propose comme origine les NSC en s'appuyant sur la communauté de marqueurs avec des CSC. Ainsi Ignatova TN et ses collaborateurs, à partir de tumeurs gliales humaines, ont isolés des précurseurs neuronaux indifférenciés ayant les mêmes

caractéristiques que les NSC (*Ignatova TN et al., 2002*). Ces précurseurs peuvent s'auto-renouveler et donner naissance à des cellules exprimant les marqueurs gliaux et neuronaux.

1.4.2. *in vivo*, modèles de souris

Afin de pouvoir déterminer la cellule « normale » susceptible d'être à l'origine des gliomes, des modèles de souris transgéniques, dans lesquels des mutations définies sont intégrées de façon spécifique dans différents types de cellule, ont été développés. Ainsi, l'inactivation à l'aide d'adénovirus des gènes suppresseurs de tumeur, tel que *Nf1*, *p53* et/ou *Pten*, aboutissait à la formation de gliomes dans la zone sous-ventriculaire aussi bien en post-natal que chez les adultes. A noter que l'occurrence des gliomes était plus rare quand les adénovirus étaient délivrés dans des zones non-neurogéniques, telles que le cortex et le striatum (*Alcantara Llaguno et al, 2009*). Récemment, un nouveau modèle de souris transgéniques (*GFAP-CreER* induit par tamoxifen) a permis d'évaluer si les astrocytes matures situés en dehors des niches prolifératives de l'encéphale de l'adulte pouvaient être à l'origine des gliomes. Dans ce dernier cas, les gènes suppresseurs de tumeur inactivés étaient *p53*, *Pten* et *Rb*. Ce modèle établi permet le ciblage spécifique de plus de 50% des astrocytes matures et seulement 1% des progéniteurs (*Chow et al, 2008*). Bien que le mécanisme de dédifférenciation des astrocytes matures dans cette étude n'ait pas été évoqué, 22% des tumeurs générées se situaient en dehors des zones prolifératives, ceci indiquant que ces astrocytes pourraient être à l'origine des gliomes. De manière intéressante, Friedmann-Morvinski et al (*Friedmann-Morvinski et al, 2012*), en utilisant des vecteurs lentiviraux Cre-inductible (shNF1-shp53 ou H-RasV12-shp53) chez des souris adultes GFAP-cre ou synapsin-Cre, ont pu obtenir des gliomes qui provenaient d'astrocytes mais également de neurones. Contrairement à l'étude de *Chow et al. 2008*, ces derniers ont élucidé de manière bien définie l'étape de dédifférenciation des astrocytes matures lorsque p53 était inactivé en combinaison avec l'activation de RAS. Dans ce dernier cas, les astrocytes matures perdaient de manière progressive l'expression de GFAP et sur-exprimaient en parallèle la nestine. De plus, ils ont constaté une augmentation de l'expression de Nanog, un facteur de transcription nécessaire pour le maintien de l'état souche des ESC comme pour les GSC. De manière intéressante, les gliomes dérivés des astrocytes matures avaient un profil transcriptomique similaire à la sous-classe mésenchymateuse agressive des glioblastomes humains. Ces observations confirment qu'un état cellulaire indifférencié est plus permissif à l'action oncogène de mutations.

Chapitre 2 : Epigénétique

L'épigénétique peut être définie comme étant l'étude des changements stables d'expression des gènes sans altération de la séquence d'ADN, héréditaires et réversibles (**Box 1**). L'épigénétique caractérise plus généralement les mécanismes qui modulent l'activité du génome sans changer sa séquence.

Box 1 : Définition de l'épigénétique

«Si les caractères de l'individu sont déterminés par les gènes, pourquoi toutes les cellules d'un organisme ne sont-elles pas identiques ?» (**Thomas Hunt Morgan**).

Une définition imagée de l'épigénétique est donnée par **Thomas Jenuwein (Research institute of molecular pathology, Vienne, Autriche)** :

« On peut sans doute comparer la distinction entre la génétique et l'épigénétique à la différence entre l'écriture d'un livre et sa lecture. Une fois que le livre est écrit, le texte (les gènes ou l'information stockée sous forme d'ADN) seront les mêmes dans tous les exemplaires distribués au public. Cependant, chaque lecteur d'un livre donné aura une interprétation légèrement différente de l'histoire, qui suscitera en lui des émotions et des projections personnelles au fil des chapitres. D'une manière très comparable, l'épigénétique permettrait plusieurs lectures d'une matrice fixe (le livre ou le code génétique), donnant lieu à diverses interprétations, selon les conditions dans lesquelles on interroge cette matrice. »

Le dogme central de la biologie moléculaire veut que l'information se transmette de l'ADN aux protéines via l'ARN sans jamais remonter dans le sens inverse. Or ce dogme est modifié avec la découverte des phénomènes de la rétrotranscription et de la réplication de l'ARN chez certains virus à ARN. De plus, ce dogme ne prend pas en compte tous les mécanismes épigénétiques qu'on retrouve dans une cellule. Ces mécanismes peuvent par exemple réguler la répression et l'activation transcriptionnelle en fonction du contexte cellulaire. Un des mécanismes possibles, de modifications de la géométrie de la chromatine, est la méthylation des histones.

2.1. Le Concept d'épigénétique

Partant du constat qu'une cellule totipotente est capable d'engendrer tous les types cellulaires d'un organisme, comment expliquer qu'une seule et unique cellule soit capable d'engendrer des cellules qui assument des fonctions différentes alors même qu'elles partagent la même information génétique? Cela signifie que certains gènes, spécifiques d'un lignage cellulaire, sont activés tandis que d'autres sont réprimés. Comment ces gènes sont-ils alors régulés?

En 1942, alors que la génétique s'intéressait à la compréhension des mécanismes de transmission des caractères héréditaires entre géniteurs et leurs descendances, un embryologiste, Conrad Waddington, s'intéresse à la compréhension des phénomènes développementaux par lesquels les gènes et l'environnement peuvent engendrer un phénotype (ensemble des caractères observables d'un individu) (*Waddington CH, 2013*). Il rassemble alors, les concepts de génétique et de développement sous le terme d'épigénétique. Il définit l'épigénétique comme une discipline de la biologie qui étudie les interactions causales entre les gènes et leurs produits, induisant ainsi un phénotype distinct (*Dupont C. et al., 2009 ; Waddington CH, 2013*). En d'autres termes, l'épigénétique fait référence à l'ensemble des voies moléculaires modulant l'expression d'un génotype vers un phénotype particulier.

Le génotype est l'information portée par le génome d'un organisme. Dans le noyau, le génome s'organise en structure nucléoprotéique, la chromatine. Sur le plan moléculaire, l'unité élémentaire de la chromatine, le nucléosome, comprend une région cœur qui est composé de 147 paires de base d'ADN qui s'enroule 1.7 fois autour d'un octamère d'histones comprenant deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4 (*Noll M et al., 1977 ; Luger, 2006 ; Kouzarides, 2007*). Sachant que l'ADN chez l'homme mesure 2 mètres environ et est contenu dans le noyau qui a un diamètre d'environ 10µm, c'est l'organisation en chromatine qui permet la compaction de l'ADN, avec également l'histone H1 qui scelle le nucléosome ce qui résulte en une plus grande compaction (**Figure 1**). La chromatine permet donc à l'ADN d'être compacté dans le noyau et contrôle ainsi l'accessibilité à l'information génétique.

La chromatine est caractérisée, selon sa structure, en euchromatine et en hétérochromatine (*Sawan et Herseg, 2010*). L'euchromatine correspond à une structure de l'ADN peu compacte, regroupant des gènes transcriptionnellement actifs (capables d'être transcrits en ARN). Tandis que l'hétérochromatine présente un niveau de compaction plus important, rendant la transcription difficile.

Les quatre histones du cœur du nucléosome figurent parmi les protéines plus conservées au cours de l'évolution ce qui suggère l'importance biologique de leur structure. Elles sont chargées positivement du fait qu'elles soient riches en lysine (K) et arginine (R). La stabilité de la structure histone-ADN est permise grâce aux liaisons ioniques entre les résidus chargés positivement des histones et les résidus phosphates chargés négativement de l'ADN (*Luger et al., 1997*). La structure de ce cœur d'histones est majoritairement globulaire exceptée pour leurs parties N-terminales qui sont non-structurées (*Kornberg, 1977*).

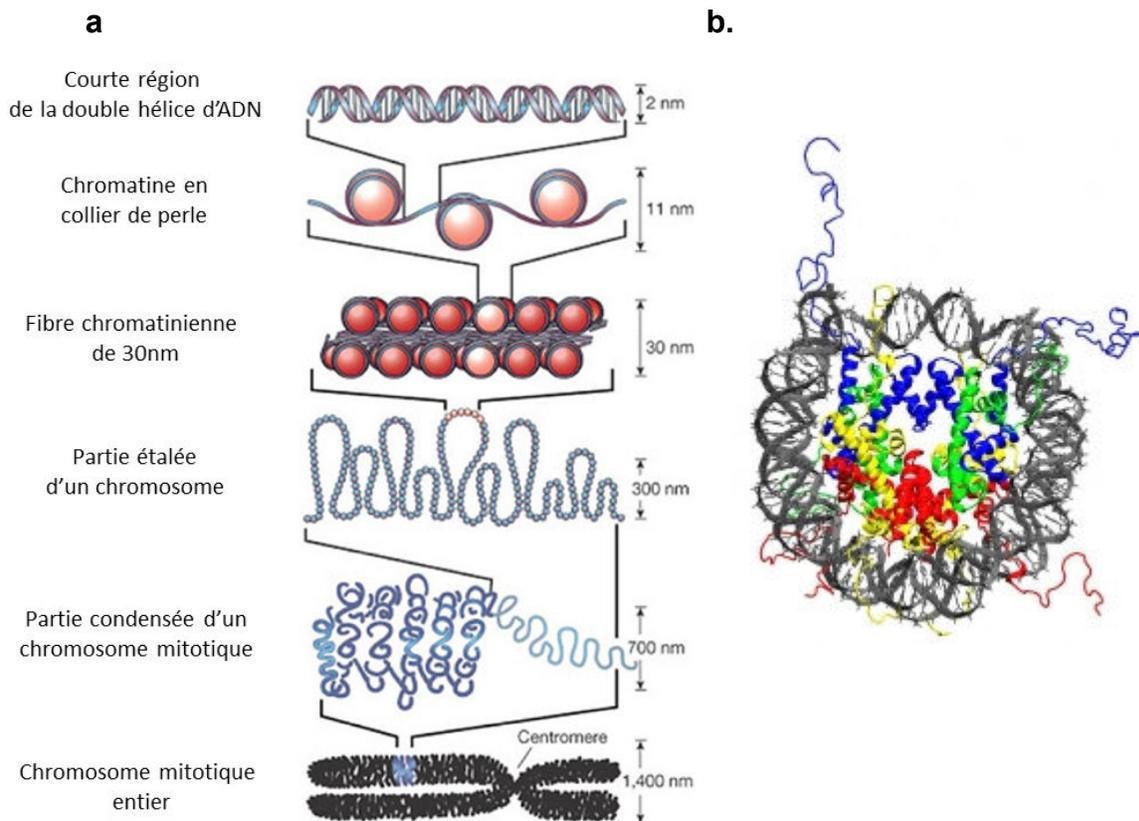


Figure 1 : Différents niveaux de compaction de la chromatine (a) et structure atomique du nucléosome (b). a. Au sein d'un noyau, il est possible de visualiser différents états de condensation de la chromatine, allant de l'ADN condensé dans les chromosomes à l'ADN nu, en passant par le 1^{er} niveau de compaction de la chromatine en collier de perle (nucléosome), puis passant par la fibre chromatinienne de 30nm jusqu'à arriver en mitose au niveau le plus élevé de compaction i.e. en chromosome. b. Les brins d'ADN sont gris et l'octamère d'histone est situé au centre de la boucle formée par l'ADN (l'histone H3 en bleu, H4 en vert, H2A en jaune et H2B en rouge). (*Adapté de Felsenfeld and Groudine, 2003*).

Depuis les recherches pionnières de Vincent Allfrey dans le début des années 60, il est connu que les histones peuvent être modifiées post-traductionnellement (*Allfrey VG et al., 1964*), et ceux principalement au niveau de leur partie N-terminale. A ce jour, il existe plus de 100 modifications différentes identifiées incluant la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination (*Bernstein et al, 2007*) (**Tableau 1**). La combinaison de ces modifications constituerait un code appelé le « code épigénétique des histones » (*Strahl et Allis, 2000 ; Jenuwein et Allis, 2001*). Ce code est lu par des protéines régulatrices pour être traduit au final en un état chromatinien particulier (i.e. actif, permissif, restrictif, inactif).

Cependant, le code épigénétique des histones n'est pas le seul régulateur de l'information épigénétique. Il existe au moins deux autres mécanismes épigénétiques importants dans le contrôle de l'expression des ARN : la méthylation de l'ADN et les micro-ARN (**Figure 2**).

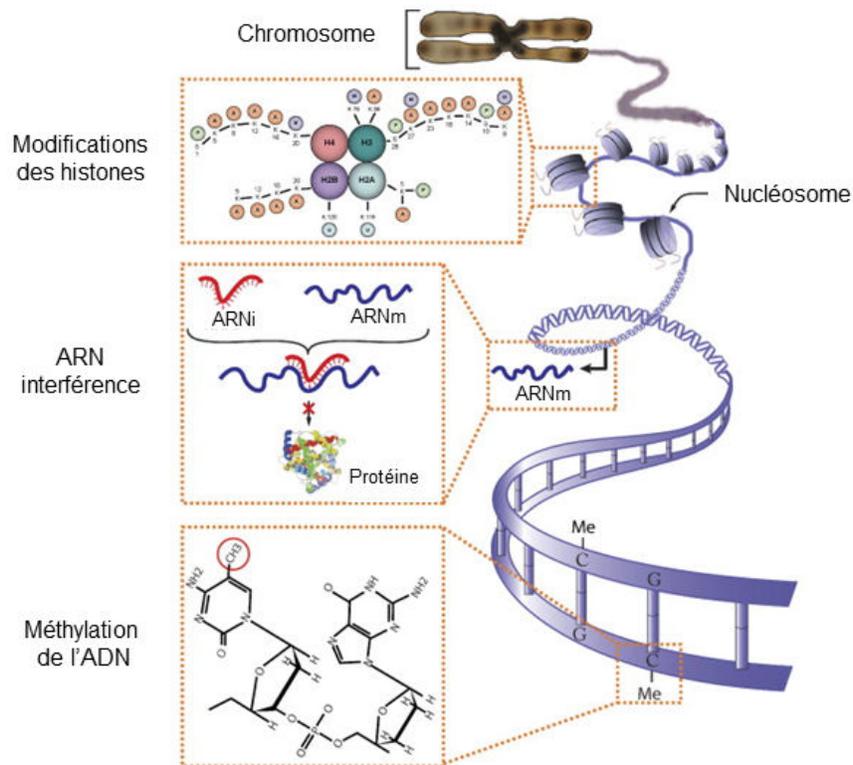


Figure 2 : Différents types d'information épigénétique. Les modifications des histones, la méthylation de l'ADN et l'ARN interférence constituent 3 distincts mécanismes de la régulation épigénétique. Les modifications des histones font référence à des modifications post-traductionnelles covalentes des parties N-terminales principalement des 4 histones (H3, H4, H2A et H2B). La méthylation de l'ADN est une modification covalente sur la cytosine (C)

localisée en 5' d'une guanine (G) dans un dinucléotide CpG. Le mécanisme épigénétique le plus récent implique les ARN interférents, qui peuvent altérer l'expression des gènes (*adapté de Sawan et al., 2008*).

La méthylation de l'ADN est une modification majeure qui a lieu uniquement sur une cytosine lorsqu'elle est suivie d'une guanidine (CpG) chez les mammifères (*Herman et al, 2003*). Les régions de l'ADN qui sont enrichies de séquences CpG (5 à 10 CpGs par 100 paires de bases) sont connues sous le nom d'îlots CpG. Ces îlots sont essentiellement situés au niveau des régions régulatrices des promoteurs des gènes (*Auclair et al, 2012*). Ils sont normalement hypométhylés et le gène associé est permissif à sa transcription (*Bird, 2002*). En revanche, lorsque ces îlots sont méthylés, le gène associé est réprimé stablement. C'est le cas des gènes du chromosome X inactif ou des gènes soumis à l'empreinte parentale (*Herman et al, 2003 ; Jaenisch et al, 2003*). La régulation épigénétique par méthylation de l'ADN est impliquée dans toutes les fonctions de la cellule, par exemple au cours du développement embryonnaire, mais également lors de l'empreinte génomique, ainsi que dans la stabilité génomique, la structure de la chromatine et par conséquent dans le cancer (*Robertson, 2005*).

Les micro-ARN (miR) ou ARN interférents sont de petits ARN endogènes de 18 à 24 nucléotides, transcrits à partir du génome cellulaire, et clivés par l'enzyme Dicer à partir d'un précurseur avec une structure secondaire caractéristique en tige-boucle (*Hutvagner G et al., 2002*) (**Figure 2**). Ils jouent un rôle important dans la régulation de la traduction et de la dégradation des ARN messager (ARNm) en s'appariant sur des sites partiellement complémentaires dans les régions non traduites (UTR) de l'ARNm (*Griffiths-Jones S, 2004*). Depuis la découverte fortuite en 1990 par Napoli, Lemieux et Jorgensen d'un phénomène d'interférence ARN, lors d'expériences sur le pétunia (*Jorgensen et al., 1990*), puis la description du mécanisme chez *Arabidopsis thaliana* en 1994 par Wassenegger (*Wassenegger et al, 1994*), et de la découverte chez *Caenorhabditis elegans* des membres fondateurs de la classe des miR, *let-7 (lethal-7)* et *lin-4 (abnormal cell lineage)* (*Lee RC et al., 1993 ; Reinhart BJ et al., 2000*), on comptabilise de nos jours plus de 2500 miR chez l'homme (d'après miRBase octobre 2013). Les miR sont impliqués dans toutes les fonctions régulatrices de la cellule, physiologiques comme pathologiques. Par exemple ils peuvent jouer un rôle d'oncogène comme le cluster *miR-17-92*, appelé aussi *oncomir-1* qui est surexprimé dans de nombreux cancers, comme les lymphomes à cellules B (*He L et al., 2005 ; Olive et al., 2010*) ou *miR-21*

qui est surexprimé dans les glioblastomes (*Chan JA et al., 2005*). Inversement, ils peuvent jouer le rôle de suppresseurs de tumeur comme par exemple *let-7* qui est sous-exprimé dans divers cancers, comme le cancer du poumon (*Takamizawa et al., 2004 ; Boyerinas et al., 2010*) et miR-34 qui est sous-exprimé dans les gliomes proneuraux (*Silber J et al., 2012*).

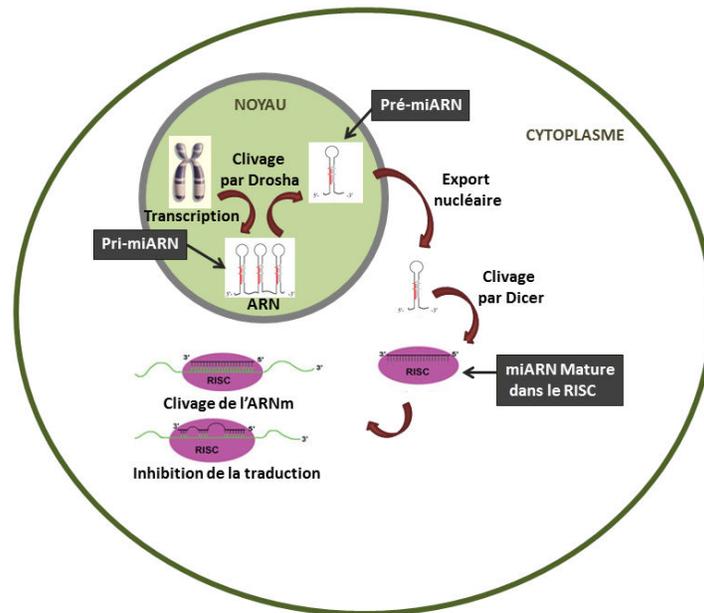


Figure 3 : Schéma représentatif de la biogénèse et du mécanisme d'action des microARNs dans les cellules mammifères. ARNm, ARN messager – miARN, microARN – RISC, RNA inducing silencing complex. (Adapté de source : <http://www.mirnatherapeutics.com/Research/miRNATechnology.aspx>)

2.2. Le « code épigénétique » des histones

Les histones sont modifiées post-traductionnellement de façon covalente au niveau de la partie N-terminale principalement et de façon plus rare dans le domaine globulaire ou la partie C-terminale. A ce jour, il existe 9 catégories de modifications post-traductionnelles connues : la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, l'ADP-ribosylation, la deimination, la proline isomérisation et la plus récemment identifiée, la propionylation (*Kouzarides, 2007 ; Liu et al., 2009*) (**Figure 4, Tableau 1**). Chaque modification peut avoir plusieurs variantes comme par exemple la méthylation des résidus lysines pouvant accepter un

mono-, di- et tri- groupement méthyle ou les résidus arginines pouvant être mono- ou diméthylés de façon symétrique ou asymétrique (Zhang et Reinberg, 2001) (voir Box 2).

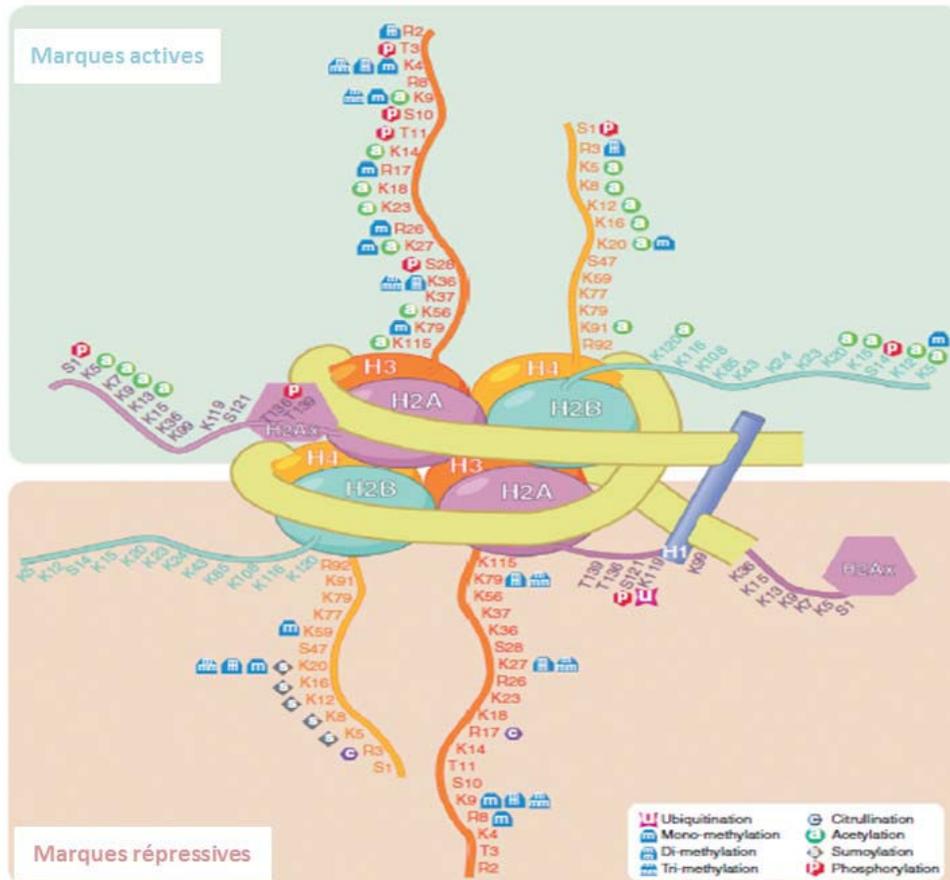


Figure 4 : Représentation schématique du nucléosome avec les modifications des histones. Les marques actives sont représentées dans la partie du haut, et les marques répressives sont dans la partie basse. Lysine (K), arginine (R), sérine (S) et thréonine (T) (adapté de Sawan et al., 2010).

Tableau 1 : Différentes classes de modifications des histones. La fonction de chaque modification est indiquée (*Kouzarides, 2007 et Berger, 2007*).

Modifications des histones	Symbole	Résidus modifiés	Effet sur transcription	Autres fonctions
Acétylation Lysine	K-ac	H3(9,14,18,56), H4(5,8,13,16), H2A, H2B	Activation	Réparation, Réplication, Condensation
Méthylation Lysine	K-me1	H3(4,36,79)	Activation	Réparation
	K-me2	H3(9,27), H4(20)	Répression	
	K-me3			
Méthylation Arginine	R-me1	H3(17,23), H4(3)	Activation	
	R-me2			
	R-me3			
Phosphorylation Sérine/Thréonine	S-ph/T-ph	H3(310,28), H2A, H2B	Activation	Réparation, Condensation
Ubiquitylation Lysine	K-ub	H2B(120) H2A(119)	Activation Répression	Réparation
Sumoylation Lysine	K-su	H2B(6/7), H2A(126)	Répression	
Isomérisation Proline	P-sis >	H3(30-38)	Activation/	
	P-trans		Répression	
Propionylation Lysine	K-prop	H3(23) H4(5,8,12,16,31,44,77,79, 91)	Activation	
Déimination (or Citrullination) Arginine	R > Cit	H2A, H3, H4	Répression	

Abbréviation : K, lysine ; R, arginine ; S, sérine ; T, thréonine ; P, proline ; ac, acétylatin ; me, méthylation ; ph, phosphorylation ; ub, ubiquitylation ; su, sumoylation ; prop, propionylation ; cit, citrullination

Box 2.

Techniques utilisées pour découvrir de nouvelles modifications des résidus histones

Spectrométrie de masse Détection direct des résidus modifiés

ChIP Immunoprécipitation de la chromatine à l'aide d'anticorps spécifiques

Bioinformatique Utilisation des données biologiques pour développer des algorithmes et des relations entre les différents systèmes biologiques

Immunoblotting Technique analytique utilisée pour détecter des protéines spécifiques

L'acétylation, la phosphorylation et la méthylation sont les modifications réversibles les plus étudiées.

L'acétylation des histones est une modification associée à une transcription active (*Brownell JE et al., 1996 ; Kuo MH et al., 1998*). Elle altère la conformation de la chromatine et facilite la liaison des facteurs de transcription à l'ADN (**Figure 5**).

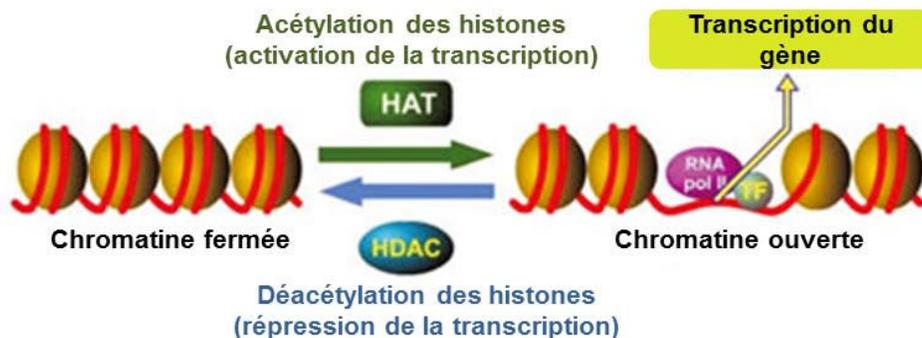


Figure 5 : Mécanisme de l'acétylation des histones. HAT pour histone acetyltransférase et HDAC pour histone déacetylase. L'acétylation des histones par les HAT permet une ouverture de la chromatine facilitant la liaison des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase II ce qui conduit à une transcription active. Tandis que la déacétylation par les HDAC conduit à une fermeture de la chromatine (*adapté de McIntyre et al., 2007*).

La phosphorylation des histones semble plutôt un intermédiaire facilitateur d'une cascade de signalisation dépendant du contexte cellulaire. Ainsi la même phosphorylation de la sérine en position 10 sur l'histone H3 (H3S10) a été impliquée dans l'activation de la transcription en facilitant l'acétylation des lysines en interphase et dans la condensation de la chromatine en métaphase au cours de la mitose (*Khorasanizadeh, 2004 ; Hsu JY et al., 2000*) (**Figure 6**).

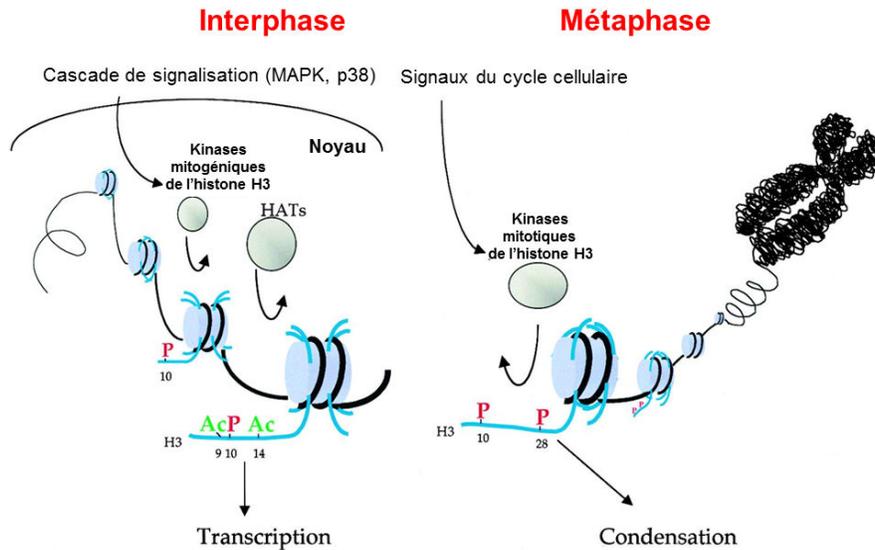


Figure 6 : Mécanismes de la phosphorylation des histones. La phosphorylation de l' H3S10 en interphase induit par des cascades de signalisation (MAPK, p38) facilite l'acétylation des histones par les HATs et conduit à une transcription des gènes. Tandis que la phosphorylation de H3S10 et H3S28 en métaphase induit par des signaux du cycle cellulaire conduit à une condensation de la chromatine (*adapté de bricker.tcnj.edu*).

La méthylation des histones est associée à une activation ou une répression de la transcription des gènes en fonction du résidu cible et de son degré de méthylation (*Sims et al., 2003 ; Mosammaparast et al., 2010*) (**Tableau 1**).

2.2.1. Méthylation des histones

2.2.1.1. Découverte

La méthylation des histones qui fut décrite pour la première fois en 1964 (*Murray, 1964*), était parmi les modifications post-traductionnelles les moins étudiées (*Strahl et Allis, 2000*). Cependant, de récentes études ont révélé que cette modification des histones était l'une des plus importantes. En effet, la méthylation des histones est une modification relativement stable qui pourrait jouer un rôle important dans la transmission de l'information épigénétique pendant la division cellulaire (*Barski et al., 2007*).

L'identification des gènes portant des modifications spécifiques des histones est possible en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre ces modifications, suivi d'un séquençage de l'ADN. Le séquençage à haut débit permet de combiner l'immunoprécipitation de la chromatine

et une analyse du génome entier (ChIP-sequencing ou ChIP-seq) (voir matériel et méthode). Ces méthodes à haut débit ont permis d'établir des corrélations statistiques intéressantes entre des séquences spécifiques d'un gène, le statut de méthylation d'un résidu lysine d'une histone et le degré de transcription de ce gène. Par exemple la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) située autour du site d'initiation de la transcription ou TSS (transcription start site), ainsi que les méthylations de la lysine 36 (H3K36) et de la lysine 79 (H3K79) dans les régions codantes, sont statistiquement significativement associées à une transcription active. Par contre, la méthylation de H3K9 et H3K27 au niveau des promoteurs est corrélée avec une répression de la transcription (*Barski et al., 2007 ; Guenther MD. et al., 2007*). Un peu paradoxalement, si la di- et la tri-méthylation de H3K27 est associées à une répression de la transcription, il a été montré que les signaux de H3K27me1 étaient plus forts dans les promoteurs actifs que dans ceux silencieux, particulièrement en aval du TSS (« Transcription Start Site ») (*Barski et al., 2007*) (**voir Figure 10**).

Les études pionnières associant les différentes modifications de méthylation des histones avec l'expression des gènes ont été effectuées dans les cellules souches embryonnaires de la souris (*Mikkelsen et al., 2007*). L'étude a montré que la triméthylation de la lysine 4 (H3K4me3) ainsi que celle de la lysine 27 (H3K27me3) était suffisante pour discriminer les gènes qui sont exprimés de ceux qui sont réprimés respectivement. Ces résultats ont été confirmés dans les cellules souches embryonnaires chez l'homme où deux équipes ont effectuées une approche similaire (*Zhao et al., 2007 ; Pan et al., 2007*). Il est important de noter que la marque active ou répressive n'est pas mutuellement exclusive. L'exemple principal est la présence des deux marques H3K4me3 et H3K27me3, appelé domaines bivalents, dans des loci de gènes importants pour le développement dans les cellules souches embryonnaires (*Bernstein BE. et al., 2006*), signifiant un état épigénétique prêt pour une activation ou une répression de la transcription (discuté plus en détail dans la partie marque bivalente). Peu d'études ont analysées ces modifications en relation avec la tumorigénèse (voir section 4).

2.2.1.2. Mécanismes de méthylation des lysines K4 et K27 de l'histone H3 : Lysines méthyltransférases (KMTs) et Lysines déméthylases (KDMs)

Les lysines peuvent comme déjà évoqué, recevoir jusqu'à 3 méthyles sur leur chaîne latérale (**Figure 7**) sur le groupe amine.

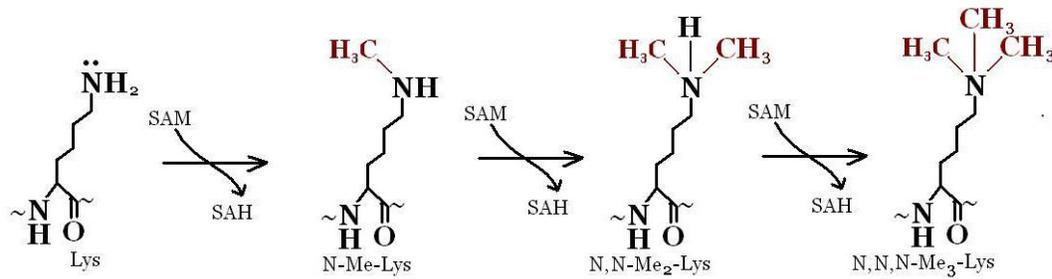


Figure 7 : Méthylation de la lysine par des lysines méthyltransférases (KMTs). Les KMTs utilisent comme donneur la molécule S-adénosyl-L-méthionine (SAM).

Les enzymes qui apposent ces méthyles aux lysines spécifiques sont appelées les lysines méthyl-transférases (KMTs). Toutes catalysent le transfert d'un groupement méthyl d'une S-adénosylméthionine (SAM) au groupe amine d'une lysine. La méthylation est réversible et les groupements méthyles peuvent être retirés par des enzymes qui sont nommées lysines déméthylases (KDMs). A ce jour, plus de 50 KMTs et 30 KDMs ont été identifiés (*Spannhoff et al., 2009 ; Arrowsmith et al., 2012*). La classification des KMTs est résumée dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Lysine méthyltransférases (KMT) humaines et leur substrat (Zhang et al., 2012).

Famille	Enzyme	Autre nom	Substrats
KMT1	KMT1A	SUV39H1	H3K9me3
	KMT1B	SUV39H2	H3K9me3
	KMT1C	G9a/EHMT2	H3K9me2 H3K27me2 H1.4K26me2 H1.2K187me2
	KMT1D	GLP/EHMT1	H3K9me2
	KMT1E	ESET/SETDB1	H3K9me3
	KMT2	KMT2A	MLL
KMT2B		MLL2	H3K4me3
KMT2C		MLL3	H3K4me3
KMT2D		MLL4	H3K4me3
KMT2E		MLL5	H3K4me3
KMT2F		hSET1A	H3K4me3
KMT2G		hSET1B	H3K4me3
KMT2H		ASH2	H3K4me3
KMT3	KMT3A	SET2	H3K36me3
	KMT3B	NSD1	H3K36me2 H4K20me2
	KMT3C	SMYD2	H3K36me2
	KMT3D	SMYD1	H3K4me
	KMT3E	SMYD3	H3K4me3
KMT4	KMT4	DOT1L	H3K79me2/3
	KMT5A	SET8	H4K20me1
KMT5	KMT5B	SUV420H1	H4K20me3
	KMT5C	SUV420H2	H4K20me3
KMT6	KMT6A	EZH2	H3K27me3
	KMT6B	EZH1	H3K27me3
KMT7	KMT7	SET7/9	H3K4me1
KMT8	KMT8	PRDM2/RIZ1	H3K9me3

Basé sur leur séquence et leur structure de leur domaine catalytique, les KMTs peuvent être classées en deux familles : les KMTs à domaine SET et les non KMTs à domaine SET. Les derniers sont représentés par un seul membre, DOT1L (Disruptor of Telomeric silencing 1 like) qui méthyle H3K79 localisée dans le domaine globulaire de l'histone H3 (Black et al., 2013).

Tandis que les KMTs soient connues depuis longtemps, la découverte de la première déméthylase des histones est récente. C'est la LSD1 (lysine-specific demethylase 1), qui révéla que le processus de méthylation des lysines est réversible (Shi et al., 2004). Jusqu'à nos jours, il y a deux familles majeures de KDMs qui ont été identifiées (Heightman et al., 2011) : la famille KDM1 et la famille contenant un domaine jumonji (JmjC KDM). La famille KDM1, qui compte seulement deux membres (KDM1A/LSD1 et KDM1B/LSD2), retire un groupe méthyle via un processus d'amine oxydase en présence d'un cofacteur FAD (Flavine Adénine Dinucléotide). Par contre, ces enzymes ne peuvent pas retirer un tri-méthyle. En ce qui concerne la famille JmjC KDM, celle-ci catalyse l'hydroxylation de la lysine via l' α -cétoglutarate et le Fe(II)-ion (Figure 8). Il y a 7 sous-groupes dans cette famille avec un total de 14 KDMs (KDM2A/B, KDM3A/B, KDM4A–D, KDM5A–D et KDM6A/B) (classification des KDMs résumée dans le Tableau 3).

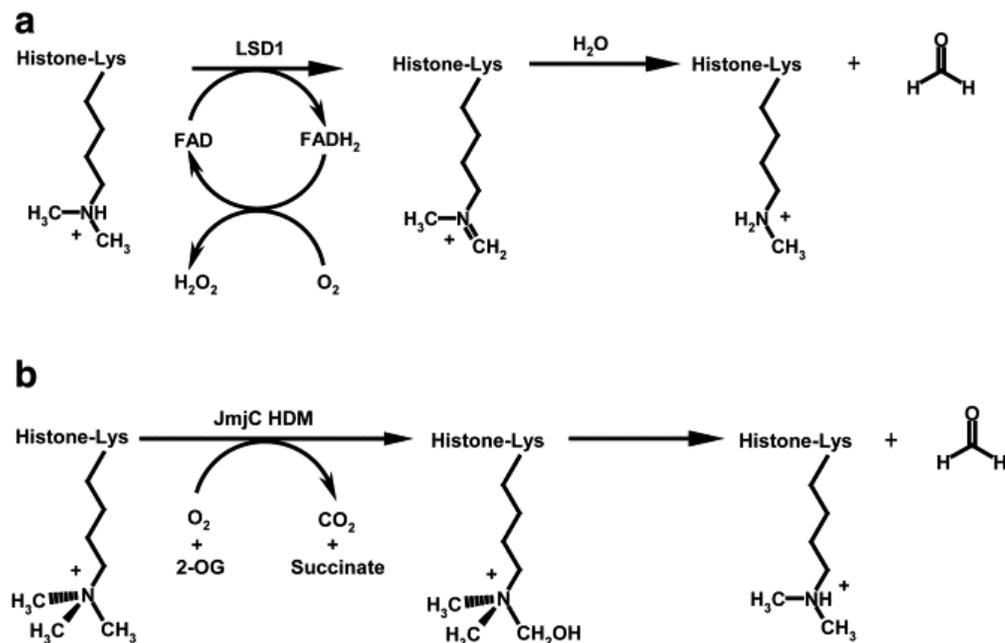


Figure 8 : Mécanismes de déméthylation des lysines des histones. a) Déméthylation catalysée par LSD1 dépendant de FAD ; b) Déméthylation catalysée par les JmjC KDM dépendant de l' α -cétoglutarate, (ou 2-oxoglutarate, 2-OG) (Marmorstein et al., 2009).

Tableau 3 : Lysine déméthylases (KDM) humaines et leur substrat (Zhang et al., 2012).

Famille	Enzyme	Autre nom	Substrats
KDM1	KDM1A	LSD1	H3K4me1/2 H3K9me1/2
	KDM1B	LSD2	H3K4me1/2 H3K9me1/2
KDM2	KDM2A	JHDM1A	H3K36me1/2
	KDM2B	JHDM1B	H3K36me1/2
KDM3	KDM3A	JHDM2A	H3K9me1/2
	KDM3B	JHDM2B	H3K9me1/2
KDM4	KDM4A	JMJD2A	H3K9me2/3 H4K36me2/3
	KDM4B	JMJD2B	H3K9me2/3 H4K36me2/3
	KDM4C	JMJD2C	H3K9me2/3 H4K36me2/3
	KDM4D	JMJD2D	H3K9me2/3
KDM5	KDM5A	JARID1A	H3K4me2/3
	KDM5B	JARID1B	H3K4me2/3
	KDM5C	JARID1C	H3K4me2/3
	KDM5D	JARID1D	H3K4me2/3
KDM6	KDM6A	UTX	H3K27me2/3
	KDM6B	JMJD3	H3K27me2/3
KDM7	KDM7A	JHDM1D	H3K9me1/2 H3K27me1/2
	KDM7B	PHF2	H3K9me1/2
	KDM7C	PHF8	H3K9me1/2 H3K27me1/2 H3K9me1/2 H3K20me1

KMTs et KDMs fonctionnent en coordination pour maintenir un équilibre de méthylation des lysines et pour réguler l'expression des gènes. Cette balance dans la machinerie enzymatique, responsable du maintien de la dynamique de la chromatine, contribue à la complexité du code histone. Les mécanismes de méthylation et déméthylation des lysines d'histone sont résumés dans la **Figure 9**.

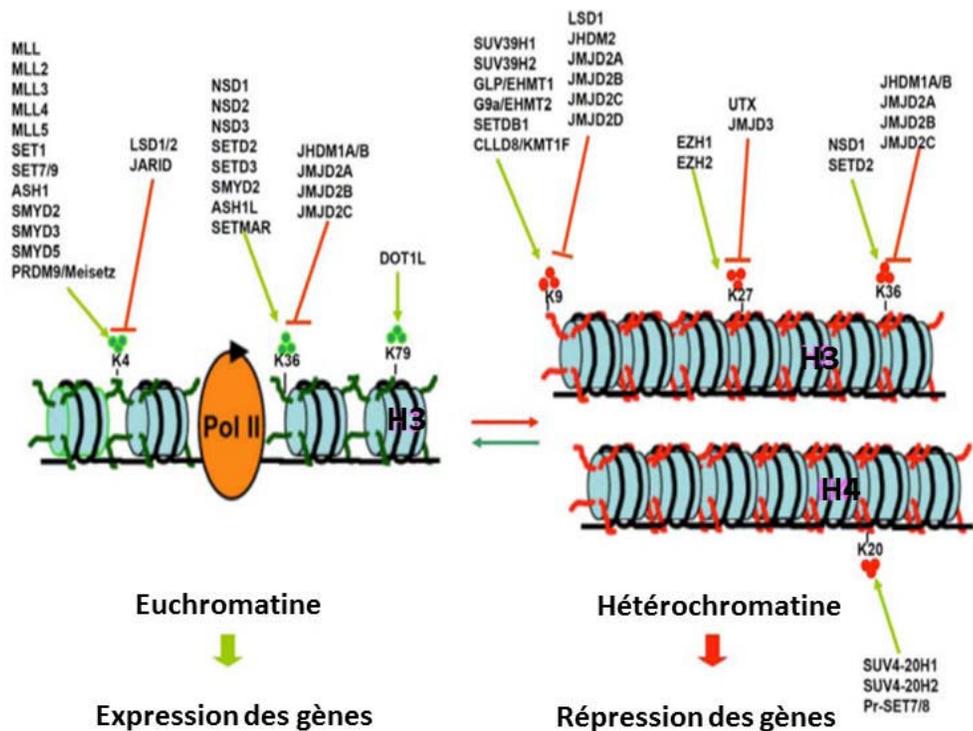


Figure 9 : Implication de la méthylation et de la déméthylation des lysines d'histone catalysées par les méthyltransférases et les déméthylases dans la régulation de la transcription des gènes. Les flèches vertes représentent les histones H3 et H4 méthyltransférases et les flèches rouges, les H3 déméthylases. En général, la méthylation des lysines H3K4, H3K36, et H3K79 est associée avec l'euchromatine et une activation de la transcription, tandis que la méthylation des lysines H3K9, H3K27 et H3K20 est liée à l'hétérochromatine et à une répression de la transcription. La triméthylation de H3K36 peut également être corrélée à une répression de la transcription (*adapté de Tian et al., 2013*).

Les principaux acteurs du code histone sont désignés par les noms suivants : « writers », « readers » and « erasers » en fonction de leur rôle (**Box3**).

Box 3.

Définition des termes

Writer Enzyme qui introduit une modification post-traductionnelle à une protéine donnée (par exemple, une histone méthyltransférase)

Reader Protéine ou complexe qui se lie spécifiquement à une protéine modifiée post-traductionnellement, avec une énergie de liaison conditionnée favorablement lors de cette modification (par exemple, les effecteurs contenant une PHD).

Eraser Enzyme qui retire une modification post-traductionnelle d'une protéine (par exemple, une histone déméthylase)

Ces acteurs du code histone (writer, reader et eraser) seront détaillés pour la marque H3K4me3 et la marque H3K27me3 par la suite.

2.2.1.3. Marque active H3K4me3

L'une des premières marques à avoir été caractérisées en détail est la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me). Il a été démontré que cette modification est présente chez les *Tetrahymena* (un protozoaire cilié) dans leur noyau géant qui est transcriptionnellement actif mais absent dans leur micronoyau qui est transcriptionnellement silencieux (Strahl et al., 1999). Il est admis aujourd'hui que la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) est fortement présente aux niveaux des régions promotrices des gènes et est très significativement associée à l'activation de la transcription (**Figure 10**). La di-méthylation (H3K4me2) quant à elle est associée à une chromatine transcriptionnellement « permissive » qui persiste même dans les régions non transcrites (Schneider R. et al., 2004 ; Santos-Rosa H. et al., 2002 ; Noma K. et al., 2001 ; Litt MD. et al., 2001 ; Liang G. et al., 2004), tandis que la mono-méthylation (H3K4me1) est présente aux niveaux des éléments amplificateurs (« enhancer elements », régions d'ADN assez éloignées du gène où se fixent des facteurs de transcription) (Heintzman ND. et al., 2009).

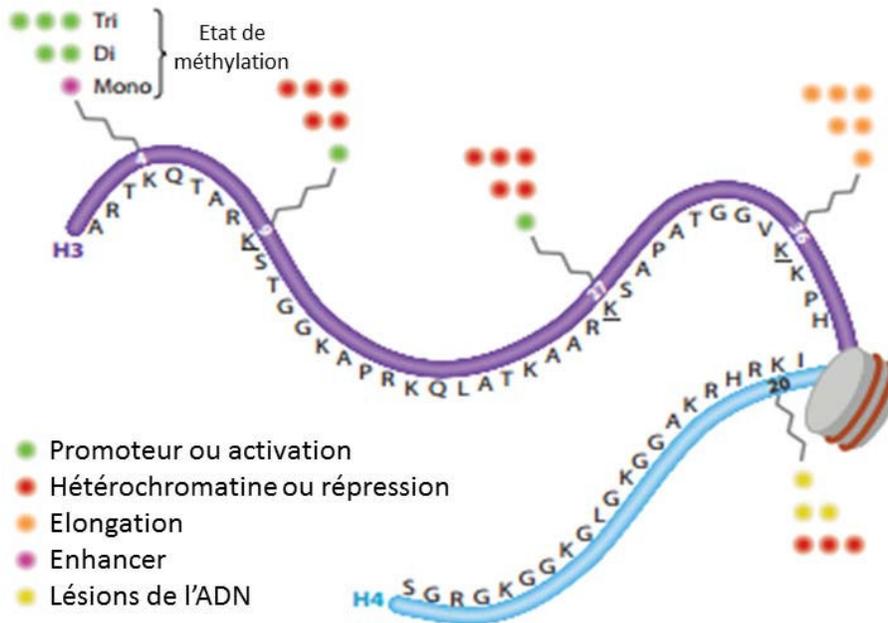


Figure 10 : Majeure méthylation des lysines sur la partie N-terminales des histones H3 (violet) et H4 (bleu). Les chiffres intégrés font référence à la position de la lysine qui est méthylée. La fonction générale de chaque état de méthylation, mono-, di- et tri- est représenté en forme de point avec différentes couleurs comme montré sur la figure (*Adapté de Mosammaparast et al., 2010*).

a. Les « writers »

Très vite, des études ont identifié la protéine SET1 (SET domain containing 1) de levure comme la méthyltransférase de H3K4 (*Santos-Rosa H. et al., 2002 ; Briggs SD. et al., 2001*). SET1 fait parti d'un complexe protéique appelé COMPASS (complex proteins associated with Set1) chez la levure. Contrairement à la levure, il existe plusieurs H3K4 méthyltransférases chez les mammifères, regroupés en deux complexes, le complexe COMPASS humain contenant SET1A ou SET1B et le COMPASS-like contenant MLL1 à MLL4 (MLL pour Mixed Lineage Leukemia). Il existe donc six méthyltransférases au total avec des fonctions essentielles et non-redondantes (*Yu BD et al., 1995 ; Lubitz S. et al., 2007*).

Les complexes COMPASS font partie d'une plus grande famille appelée le groupe Trithorax (TrxG). C'est la famille qui a des propriétés complémentaires à celles du groupe Polycomb (discuté dans la partie H3K27). Les protéines du TrxG sont des régulateurs de la chromatine conservées au cour de l'évolution et peuvent être divisées en trois classes basées sur leur

fonction (*Schuettengruber B. et al., 2011*). La première classe comprend les facteurs contenant des domaines pouvant méthyler les histones (les « writers ») (*Eissenberg JC. Et al., 2010*). La seconde classe contient les facteurs remodelant la chromatine et dépendant de l'ATP, incluant les protéines pouvant « lire » les marques d'histones méthylées ayant été posé par les protéines à domaine SET. Enfin, la troisième classe de TrxG comporte les protéines TrxG qui peuvent directement se lier à des séquences spécifiques de l'ADN. Ces différentes protéines exercent leur fonction en coopérant pour réguler l'expression des gènes.

b. Les « readers »

Comment la méthylation de H3K4 modifie-t-elle les événements biologiques d'aval? De nombreuses preuves suggèrent que la méthylation des histones agit en recrutant des protéines effectrices qui exécutent des fonctions spécifiques sur la chromatine (*Kim J. et al., 2006 ; Shi X. et al., 2006 ; Wysocka J., 2006 ; Wysocka J. et al., 2006*). Plusieurs domaines ont la capacité de se lier aux lysines méthylées dans le contexte de l'extrémité N-terminale de l'histone H3, avec une préférence pour différents degrés de méthylation (non-méthylée versus mono versus di versus tri) (*Sims RJ 3rd, Reinberg D, 2006 ; Sims RJ 3rd et al., 2006*). Les H3K4 effecteurs connus peuvent être classés en 2 superfamilles distinctes : la superfamille royale (incluant les chromodomaines et les domaines tudor) et la superfamille de l'homéodomaine (PHD pour Plant Homeo Domain) (*Maurer-Stroh S. et al., 2003 ; Bienz M., 2006*).

c. Les « erasers »

Deux familles sont capables de retirer la méthylation sur H3K4 : les LSD (1 et 2) et la sous-famille JARID1 de la famille des protéines jumonji (JmjC).

Les LSD1 et 2 ne peuvent pas déméthyle H3K4me3 contrairement à JARID1 (*Ciccone DN. et al., 2009 ; Karytinov A. et al., 2009*). JARID1 comprend 4 membres: JARID1A, JARID1B, JARID1C, et JARID1D (KDM5A-D) qui peuvent tous déméthyle des tri et di-méthyles (*Christensen J. et al., 2007 ; Iwase S. et al., 2007 ; Klose RJ. et al., 2007 ; Lee MG. et al., 2007a ; Tahiliani M. et al., 2007 ; Yamane K. et al., 2007*). En accord avec la méthylation de H3K4 impliquée dans la transcription, les résultats récents indiquent que les protéines JARID1 fonctionnent comme des répresseurs de la transcription à travers la déméthylation de H3K4me3/me2, et à travers le recrutement d'autres répresseurs modifiant la chromatine (*Christensen J. et al., 2007 ; Iwase S. et al., 2007 ; Klose RJ. et al., 2007 ; Lee MG. et al., 2007a ; Tahiliani M. et al., 2007*).

2.2.1.4. Marque répressive H3K27me3

Compte tenu de leur importance fonctionnelle dans le contrôle de la marque H3K27 il convient de décrire ici les complexes Polycomb répresseurs 1 et 2. Pour mémoire le premier complexe Polycomb à être biochimiquement purifié chez la Drosophile a été appelé « Polycomb repressive complex 1 » (PRC1) et contient les protéines polycomb PcG (PC), « polyhomeotic » (PH), « posterior sex comb » (PSC) et les dRING parmi d'autres polypeptides (Shao *et al.*, 1999). D'autres études ont défini biochimiquement un autre complexe polycomb chez la Drosophile qui est PRC2 ou ESC-E(Z), où les sous-unités essentielles sont les protéines PcG Extra sex combs (Esc), le zeste d'enhancer [E(z)], le suppresseur de zeste 12 [Su(z)12] et la protéine liée à l'histone NURF55 (histone-binding protein NURF55) (Czermin *et al.*, 2002 ; Müller *et al.*, 2002 ; Tie *et al.*, 2003). Ce sont les deux complexes les mieux caractérisés (Margueron *et Reinberg*, 2011) (**voir Tableau 4**).

Tableau 4 : Rôle des composants de PRC1 et PRC2 (Aloia *et al.*, 2013)

	Drosophile	Fonction moléculaire	Mammifères	
PRC1	Ring	E3 ubiquitine ligase	Ring 1A Ring 1B Ring 1A/ Ring 1B	
	Psc	Régulation de l'activité enzymatique	Bmi1 Mel18 Mel18/Bmi1	
	Ph	Non clair	Phc1/Phc2	
	Pc	Recrutement de PRC1 canonique à la chromatine	Cbx2 Cbx4 Cbx6 Cbx7 Cbx8	
	Rybp	Recrutement de PRC1 non-canonique à la chromatine	Rybp	
	Sfmbt		L3mbtl2	
	Kdm2		Kdm2b	
	E(z)	Histone méthyltransférase	Ezh1 Ezh2	
	PRC2	Su(z)	Essentiel pour l'activité enzymatique	Suz12
		Esc	se lie à H3K27me3	Eed
Pcl		Recrutement à la chromatine	Pcl1 Pcl2 Pcl3	
Jarid2		Recrutement à la chromatine	Jarid2	

Comme modificateurs épigénétiques, les complexes PcG stimulent la répression des gènes à travers des modifications particulières de la chromatine et de compaction (**Figure 11**). En particulier, PRC2 est responsable de la di- et tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me2/me3) (**Figure 11A**) (Cao *et al.*, 2002 ; Czermin *et al.*, 2002 ; Kuzmichev *et al.*, 2002 ; Müller *et al.*, 2002). PRC1, en revanche, est le médiateur de la monoubiquitylation de l'histone H2A, qui stoppe l'élongation transcriptionnelle (Stock *et al.*, 2007) et est crucial pour la répression de l'expression en particulier de gènes du développement (Endoh *et al.*, 2012) (**Figure 11B**). PRC1 réprime également les gènes à travers d'autres mécanismes comme la compaction de la chromatine (**Figure 11C**) (Francis *et al.*, 2004; Endoh *et al.*, 2012) et en réduisant la rotation (« turnover ») des nucléosomes (assemblage, éviction et remplacement des nucléosomes) (Deal *et al.*, 2010).

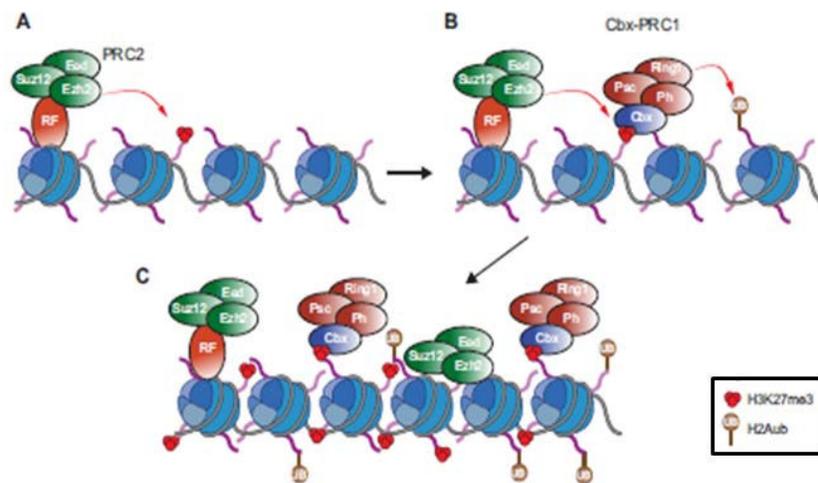


Figure 11 : Fonctions moléculaires de PRC1 et PRC2. (A) PRC2 catalyse la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3. Des facteurs spécifiques de recrutement (RF), comme Jarid2 et les protéines Pcl, sont responsables de cibler PRC2 au loci génomique. (B, C) Les protéines Cbx se lient à la marque H3K27me3 et recrutent le complexe canonique PRC1 à la chromatine, qui à leur tour vont mono-ubiquitiner la lysine 119 de l'histone H2A (H2Aub) (B) et compacter la chromatine (C) (*adapté de Aloia et al., 2013*).

a. Les « writers »

Chez les mammifères, Ezh1 et Ezh2, homologues de E(z) chez la drosophile, sont les histones méthyltransférases responsable de l'activité enzymatique de PRC2 et de l'apposition de la marque H3k27me2/me3 (les « writers ») (*Margueron et al., 2008*). Les autres membres du cœur de PRC2 comprennent Suz12, homologue de Su(z) et Eed, homologue de Esc qui sont nécessaires pour l'assemblage du complexe et pour la propre activité enzymatique de PRC2 (*Cao and Zhang, 2004; Pasini et al., 2004; Ketel et al., 2005*).

b. Les « readers »

Chez les mammifères, la composition de PRC1, comparée à la drosophile, est bien plus diverse et varie en fonction du contexte cellulaire (**Tableau 4**) (*Gao et al., 2012; Luis et al., 2012*). Les complexes PRC1 peuvent être divisés au moins en deux classes en fonction de la présence ou l'absence des protéines Cbx, qui sont les homologues de Pc chez la drosophile.

Les complexes PRC1 canoniques contiennent les protéines Cbx qui reconnaissent et se lient à H3K27me3 (les « readers »), marque déposée par PRC2 (**Tableau 4**). Donc les complexes canoniques PRC1 et PRC2 peuvent agir ensemble pour réprimer la transcription des gènes (**Figure 11C**). Plus précisément, ce sont les chromodomaines des protéines Cbx qui reconnaissent la marque H3K27me3 (*Fischle et al., 2003*), et qui recrutent les complexes canoniques PRC1, amenant PRC1 et PRC2 à co-occuper les mêmes loci de chromatine (*Morey et al., 2012*).

c. Les « erasers »

Quatre groupes (*Agger et al., 2007; De Santa et al., 2007; Lan et al., 2007; Lee et al., 2007b*) ont reporté la découverte de UTX (Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome, ou KDM6A) et JMJD3 (Jumonji Domain-Containing Protein 3, ou KDM6B), deux protéines contenant un domaine Jumonji C (JmjC), comme étant les enzymes qui déméthylent spécifiquement la lysine 27 di- et tri-méthyle (H3K27me2/me3) sur l'histone H3. UTX et JMJD3 appartiennent au même groupe phylogénétique et sont très exprimées dans les cellules souches embryonnaires (*Boyer et al., 2006*). Ces deux enzymes sont impliquées dans l'activation transcriptionnelle des gènes, à la reprogrammation épigénétique et au contrôle du destin cellulaire dépendant de RB («retinoblastoma tumor suppressor protein») (*Agger et al., 2007; Wang et al., 2010; McLaughlin-Drubin et al., 2011*).

D'autres H3K27 déméthylases appartenant à la famille KDM7 existent : PHF8 (connu également comme KDM7C) et JHDM1D (connu sous les noms également de KDM7A ou KIAA1718), qui retirent les mono- et di-méthyles de H3K27. Ces enzymes contiennent un doigt PHD qui se lie à H3K4me3 et cette reconnaissance est essentielle pour leur spécificité de substrat, l'occupation génomique et la régulation de l'expression de gène cible (*Horton et al. 2010 ; Yu et al., 2010*).

2.2.1.5. Marque Bivalente

Les domaines bivalents ont été identifiés dans les cellules souches embryonnaires (ESCs) de souris (*Azuara et al., 2006 ; Bernstein et al., 2006*). Ce sont des régions de la chromatine caractérisées par la présence des deux marques opposées, active (H3K4me3) et répressive (H3K27me3) pour la transcription des gènes. Comme décrit précédemment, la marque répressive H3K27me3 est déposée par PRC2 qui en retour recrute PRC1. En parallèle, la marque H3K4me3 est déposée par le complexe trithorax/MLL (*Schuettengruber et al., 2011*). De telles régions ne sont pas unique aux ESCs mais ont été aussi identifiées dans d'autres cellules souches multipotentes (*Mohn et al., 2008; Cui et al., 2009*).

En plus de la présence de la marque activatrice H3K4me3, les gènes bivalents sont caractérisés par la présence de l'ARN polymérase II en mode « veille » (« poised ») (**Figure 12A**) (*Brookes et al., 2012*). Malgré cela, les gènes demeurent transcriptionnellement réprimés. Les modèles courants proposent que la bivalence autorise une rapide transition, de la répression à l'activation, des gènes du développement lors d'un stimulus de différenciation (*Azuara et al., 2006; Bernstein et al., 2006*). Une fine régulation des domaines bivalents est essentielle pour un bon développement, car ils régulent le déroulement précis de l'expression des gènes durant la pluripotence et la différenciation (*Jia et al., 2012*).

Lors de la différenciation des ESCs, les domaines bivalents ont besoin d'être résolus en loci génomique activés ou réprimés qui accompagne le processus de différenciation (**Figure 12B**) (*Mikkelsen et al., 2007; Alder et al., 2010*).

L'établissement de marques bivalentes est un mécanisme conservé dans l'évolution pour réguler les caractéristiques clés des cellules souches que sont l'auto-renouvellement et la différenciation (voir section différenciation).

2.3. H3K4me3, H3K27me3 et différenciation cellulaire

De nombreuses études ont exploré le changement des marques H3K4me3 et H3K27me3 au cours de la différenciation cellulaire (Wei et al., 2009 ; Lien et al., 2011 ; Akkers et al., 2009 ; Abraham et al., 2013). La différenciation cellulaire implique une perte de la pluripotence et un gain dans un lignage vers un type cellulaire spécifique (Hemberger et al., 2009).

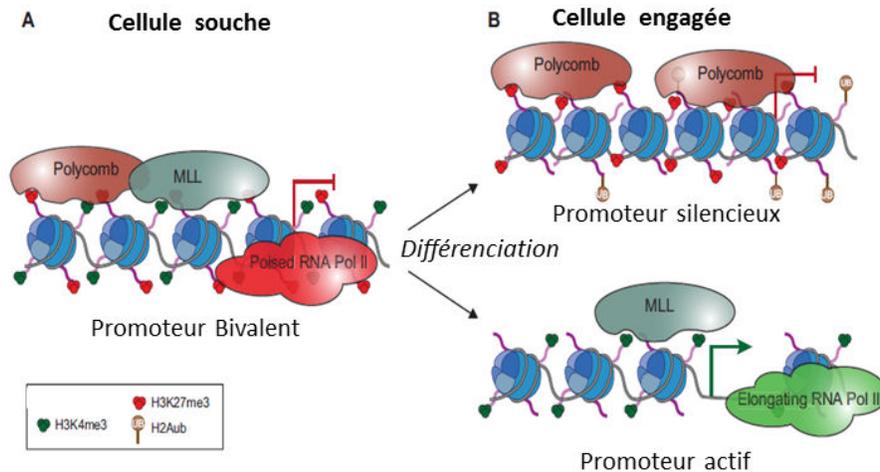


Figure 12 : Rôle des promoteurs bivalents dans le destin cellulaire. (A) Les domaines bivalents sont caractérisés par la présence des deux marques active (H3K4me3) et répressive (H3K27me3) déposées par les complexes MLL et polycomb, respectivement. Dans les cellules souches, les domaines bivalents sont trouvés dans de multiples gènes du développement qui sont silencieux. (B) La présence de H3K4me3 et de l'ARN polymérase II en mode « veille » (« poised ») autorise une activation rapide de la transcription lors d'un stimulus de différenciation : les domaines bivalents sont résolus en gènes activement transcrits (caractérisés par la présence de H3K4me3 et la perte de H3K27me3) et en gènes silencieux (caractérisés par la présence de H3K27me3 et la perte de H3K4me3) en fonction de la fonction du gène et du type cellulaire (adapté de Aloia et al., 2013).

Par exemple, les enzymes antagonistes UTX (H3K27 déméthylase) et MLL2/3 (H3K4 méthyltransférase) agissent de concert pour réguler l'expression des gènes comme les gènes *Hox* (Lee et al., 2007b). Un autre exemple d'association entre deux enzymes antagonistes

essentielles pour la différenciation, est l'interaction entre RBP2 (Retinol Binding Protein 2, connu également comme Jarid1a), une H3K4 déméthylase, avec PRC2 (H3K27 méthyltrasférase). En effet, le complexe PRC2 recrute RBP2 au niveau de son gène cible, et cette interaction est requise pour l'activité répressive médiée par PRC2 durant la différenciation embryonnaire (Pasini et al., 2008) (**Figure 13**).

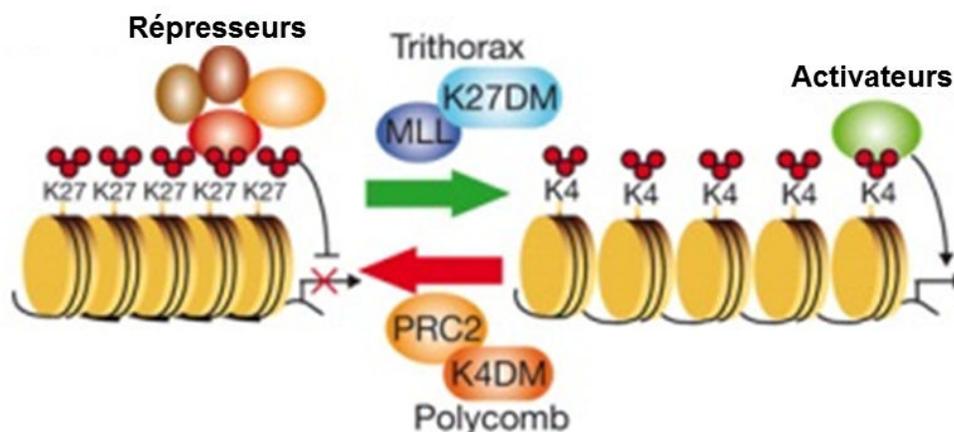


Figure 13 : Implication des H3K27me3 déméthylases dans la régulation transcriptionnelle des gènes du développement. K27DM, déméthylase spécifique de la Lysine 27; K4DM, déméthylase spécifique de la lysine 4. Petits cercles rouges, groupes méthyles (modifié de Agger et al., 2007).

2.4. H3K4me3, H3K27me3 et cancer

Le rôle crucial des modifications des histones dans la détermination du destin cellulaire a conduit à l'hypothèse d'un rôle dans le processus aboutissant à établir des populations de cellules initiatrices de tumeurs au cours de la tumorigénèse (Feinberg et al., 2010). Des changements globaux dans les modifications des histones ont été observés dans plusieurs types de cancers, et ces études nous ont fourni un premier aperçu de la façon dont le paysage épigénétique pourrait être modifiés lors de la tumorigénèse (Seligson et al., 2005 ; Fraga et al., 2005).

En particulier, les lysines histones déméthylases, spécialement celles qui suppriment la méthylation sur H3K4 et H3K27, sont trouvées mutées ou dérégulées dans des cancers

humains (**Tableau 5**). On trouve également des mutations de MLL (histone H3K4 méthyltransférase) et des dérégulations d'EZH2 (histone H3K27 méthyltransférase) qui sont impliqués dans le développement de certains cancers (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Dérégulation de H3K4me3 et H3K27me3 associée au développement du cancer

Catégorie	Nom du gène / synonyme	Altérations	Cancer humain associé	Références
H3K4me3				
writer	MLL1	réarrangement	leucémie myeloïde et lymphoïde	<i>Krivtsov et al., 2007</i>
	MLL2	mutation somatique	carcinome des cellules rénales	<i>Dalgliesh et al., 2010</i>
reader	ING1-5	mutations perte de fonction (mutation somatique, perte allélique, sous-expression et séquestration cytoplasmique aberrante)	diverses tumeurs solides	<i>Coles et al., 2009 ; Ythier et al., 2008 ; Soliman et al., 2007</i>
	PHF23	translocation chromosomique fusionnant PHF23 à NUP98	leucémie myeloïde	<i>Wang GG et al., 2009</i>
	PYGO2	sur-expression	cancer du sein	<i>Gu et al., 2009 ; Andrews e al., 2007</i>
eraser	LSD1 / KDM1A	sur-expression	cancer de la prostate, neuroblastome, carcinome colorectal, cancer de la vessie	<i>Kahl et al., 2006 ; Hayami et al., 2011 ; Schulte et al.,</i>

				2009
		sous-expression	cancer du sein	Wang Y et al., 2009
JARID1A / RBP2 / KDM5A		sur-expression	cancer gastrique et cancer du sein	Zeng et al., 2010 ; Hou et al., 2012
		translocation chromosomique fusionnant JARID1A à NUP98	leucémie myéloïde aiguë	Wang GG et al., 2009
JARID1B / PLU1 / KDM5B		sur-expression	cancer du sein, de la prostate, de la vessie, du poumon	Lu et al., 1999 ; Xiang et al., 2007 ; Hayami et al., 2010 ; Yamane et al., 2007 ; Scibetta et al., 2007
		sous-expression	mélanome malin	Roesch et al., 2005
JARID1C / KDM5C		mutation perte de fonction	carcinome du rein	Dagliesh et al., 2010
H3K27me3				
writer	EZH2	sur-expression	tumeurs solides variées incluant cancer de la prostate, du sein, du colon, de la peau et du poumon	Simon et al., 2008
		mutation perte de fonction et haploinsuffisance	lymphome folliculaire, lymphome diffus à grandes cellules B	Morin et al., 2010

eraser	UTX / KDM6A	Mutation perte de fonction	Multiple cancers incluant myélomes multiples, carcinomes epidermoïde de l'œsophage, carcinomes à cellules rénales et leucémie myélomonocytaire chronique	<i>Dalgliesh et al., 2010 ; van Haaften et al., 2009 ; Jankowska et al., 2011</i>
	JMJD3 / KDM6B	sous-expression	carcinomes du poumon, du foie et malignités hématopoïétiques variées	<i>Agger et al., 2009 ; Barradas et al., 2009</i>
	PHF8 / JHDM1F / KDM7C	sur-expression	cancer de la prostate	<i>Bjorkman et al., 2012</i>

EZH2, enhancer of zeste homolog 2 ; ING, inhibitor of growth ; JARID1, jumonji AT-rich interactive domain 1 ; JHDM1B, jumonji C domain-containing histone demethylase 1B; JMJD3, jumonji domain containing 3 ; MLL, mixed lineage leukaemia ; PHF23, PHD finger protein 23 ; Pygo, pygopus ; UTX, ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat X chromosome. (**Modifié de Suzuki et al., 2013 et Chi et al., 2010**)

Seules quelques études dans le cancer ovarien (*N Chapman-Rothe et al., 2012*), et très récemment dans les glioblastomes (*Rheinbay E et al., 2013 ; Natsume A et al., 2013*), ont fait une analyse à grande échelle des gènes portant les marques H3K4me3 et H3K27me3 en comparant des cellules souches cancéreuses à des cellules ayant perdu leurs propriétés souches. *Rheinbay E et al., 2013* ont comparé des GSCs avec des cellules souches neurales (NSCs) dérivées de cellules souches embryonnaires, des astrocytes normales humaines (NHAs) dérivées de cerveau foetal et des lignées cellulaires de glioblastome cultivées en sérum provenant de la même tumeur que les GSCs. Ils ont montré qu'ASCL1 un facteur de transcription, active la voie Wnt en réprimant le régulateur négatif DKK1 et est essentiel pour la maintenance et la tumorigénicité *in vivo* des cellules souches des glioblastomes. L'étude menée

par le Docteur Yutaka Kondo, montre que l'interconversion biologique entre les GSCs et les non-GSCs différenciés est fonctionnellement plastique et s'accompagne du gain ou de la perte du complexe polycomb répressif PRC2, un complexe qui modifie la structure de la chromatine (*Natsume A et al., 2013*).

Dès le début de ma thèse en septembre 2009, nous nous sommes focalisés sur l'étude des gènes portant les marques H3K4me3 ou H3K27me3 ou les deux lors de la perte des propriétés souches et tumorigènes des GSCs, d'abord en utilisant une différenciation induite par le sérum de veau fœtal puis à l'aide du modèle du cluster miR-302-367.

Matériels et méthodes

Cette recherche a été menée en accord avec la déclaration d'Helsinki, des lois françaises, et a été approuvée par le comité d'examen institutionnel de l'hôpital Sainte-Anne à Paris.

1. Matériel

1.1. Matériels, appareils

Produit	Fournisseur
Matériels et appareils	
Amaxa nucleofector electroporator	Amaxa Biosystems AAD-1001S
Axioplan Axiovision 4.6.3	Zeiss
Dounce homogenizer with tight-fitting « B » pestle	Kimble kontes
Dynamag®-Spin Magnet	Life technologies 12320D
Electrophoresis power supply PowerPac 3000	Bio-Rad 350-034
Hybond-C extra	Amersham, UK RPN203E
Hypercassette autoradiography cassette	Amersham RPN11642
Hyperfilm ECL	Amersham, GE Healthcare, Life sciences 28906836
Novex semi-dry Blotter	Invitrogen, Life technologies SD1000
Nupage 4-12% Bis-Tris Gel 1.5mm x 10 wells	Invitrogen, Life technologies NP0321BOX
Slide superfrost	Fischer Scientific, France
Sonics Vibracell VCX 130 sonicator	Mediatech Scientific
Taqman 7500 Fast	Invitrogen

Tubes and tips DNase-RNase free	Dutscher
Wathman paper	GE Healthcare, Life sciences 3030917
Volocity 3D analysis software	Perkin Elmer
X cell Surelock Mini-cell	Invitrogen E10001

1.2. Matériel biochimique

– Produits

Tableau 1: Liste des produits biochimiques utilisés.

Produit	Fournisseur
Protéines et inhibiteurs enzymatiques	
Aprotinine	Sigma-Aldrich, France
human b-FGF	AbCys P100-18B
Benzamidine Hydrochloride : Hydrate	Sigma-Aldrich, France
human EGF	AbCys
Leupeptine	Sigma-Aldrich, France
Pepstatine	Sigma-Aldrich, France
PMSF (<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)	Sigma-Aldrich, France
1,10-Phenanthroline	Sigma-Aldrich, France
Tampons	
HEPES	Gibco, Invitrogen 15630-056
MES running buffer 20X	Invitrogen

TBS 20X (<i>Tris Buffered Saline Buffer</i>)	Interchim
TG 10X (<i>Tris-Glycine</i>)	Amresco
Tris HCl pH 6.8 (<i>Tris hydrochloride</i>)	Biorad
NaOH 1N (<i>Sodium hydroxide</i>)	Fluka 319511
Produits de culture cellulaire	
B27 Supplement	Gibco, Invitrogen 17504-044
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Gibco, Invitrogen 31600-083
F12	Gibco, Invitrogen 21700-026
G5 supplement	Gibco, Invitrogen 17503-012
N2 Supplement	Gibco, Invitrogen 17502-048
NeuroCult Proliferation kit humain	StemCell Technology 05751
NeuroCult NSC Proliferation kit mouse	StemCell Technology 05702
Penicilline/Streptomycine	Fischer W3470H
Sérum de veau foetal	Pan-Biotech cat n°P30-3302 lot P283109
Trypan Blue	Sigma-Aldrich, France T8154
Détergents	
NP-40 (<i>4-Nonylphenyl-polyethylene glycol</i>)	Sigma-Aldrich, France
Saponin	Sigma-Aldrich, France S-4521
SDS (<i>Dodecyl sodium sulfate</i>)	Sigma-Aldrich, France 71736
Triton	Molecular Biology 20182332
Tween 20	Molecular Biology 20452335
Autres	

Bleu de Bromophénol	Sigma-Aldrich, France
BSA (Bovine serum albumine)	Sigma-Aldrich, France
BSA purified 100X	New Englands Biolabs
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Sigma-Aldrich, France
EDTA 0.5M (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)	Gibco, Invitrogen
EGTA 0.5M (<i>Ethyleneglycol-O, O'-bis(2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraacetic acid</i>)	Sigma-Aldrich, France
Ethanol	Amresco
Fluoromount	Southernbiotech
Glucose	Sigma-Aldrich, France D9434
Glutamine	Gibco, Invitrogen 25030-024
Glycérol	Invitrogen
Glycine	Sigma-Aldrich, France
H₂O Braun	Braun medical 0066571E
Heparin	Sigma-Aldrich, France
Lait écrémé	Régilait, France
Methanol	Sigma-Aldrich, France
Na⁺ Orthovanadate	Sigma-Aldrich, France
NaCl (<i>Sodium Chloride</i>)	Sigma-Aldrich, France
β-Glycérophosphate	Sigma-Aldrich, France
β-Mercapto-éthanol	Sigma-Aldrich, France
Paraformaldéhyde	Sigma-Aldrich, France
PBS 10X	Invitrogen 14200-059
Sodium Bicarbonate	Gibco, Invitrogen 25080-060

Sybr Green	Qiagen
Kits	
Amaxa cell line nucleofector kit L	Amaxa biosystems, Lonza, France
BCA Protein Assay	Thermo-Scientific
ChIP-IT[®] Express Chromatin Immunoprecipitation	Active Motif 53008
Dual-Luciferase Reporter Assay	Promega
ECL detection kit	PerkinElmer, France
MinElute Reaction Cleanup	Qiagen
QuantiTect Reverse Transcription	Qiagen
Qubit[®] dsDNA HS Assay	Invitrogen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy Plus Universal	Qiagen

– **Anticorps et siRNA**

Tableau 2: Liste des anticorps, siRNA et plasmides utilisés.

Produit	Fournisseur
Anticorps primaires	
Anti-actin	Chemicon, MAB1501R, lot NG1867683
Anti-arnt2	Santa Cruz, Biotechnology, sc-5581, lot J2909
Anti-Histone H3	Abcam, ab46761, lot GR13524-1
Anti-nanog	R&D systems, AF1997, lot KKJ0511061
Anti-trimethyl-histone H3 (Lys 4)	Upstate-Millipore 07-473, lot JBC1888194 / Cosmobio, MCA-MAB10004, lot 11001

Anti-trimethyl-histone H3 (Lys 27)	Upstate-Millipore 07-449, lot JBC 1873477
Anticorps secondaires	
anti-goat A555	Invitrogen, A21432, lot 439379
anti-rabbit A488	Invitrogen, A11008, lot 51385A
HRP anti-mouse	Santa Cruz, Biotechnology
HRP anti-rabbit	Bio-Rad
siRNA et plasmides	
siRNA ARNT2 A	Ambion, s19227
siRNA ARNT2 C	Santa Cruz, Biotechnology, sc-29735
siRNA scrambled	Ambion, 4390843
Plasmide pGF-CMV-luciferase	New England Biolabs
Plasmide pGF-CMV-HIF1a-luciferase	New England Biolabs
Plasmide-pGL3-luciferase	Promega
Plasmide-pGL3-Sox2-luciferase	Huck-Hui Ng (Singapour)
Plasmide-pGL4-luciferase	Promega
Plasmide-pGL4-Nanog-luciferase	Addgene
Plasmide Renilla	Promega

1.3. Matériel biologique

Les cultures primaires de cellules souches cancéreuses (glioma stem cell ou GSC) ont été obtenues à partir de gliomes de haut-grade de l'adulte et de l'enfant. Leur isolement et leur caractérisation sont décrits dans les articles suivants : *Surena et al., 2009*; *Patru et al., 2010*;

Thirant et al., 2011; Silvestre et al., 2011, Galan-Moya et al., 2011. Les caractéristiques histopathologiques des tumeurs dont ces GSC sont issues sont résumées dans le tableau 1, page 79. Les GSC sont cultivées dans un milieu défini en présence des facteurs de croissance EGF (Epidermal growth factor) et bFGF (basic fibroblast growth factor) (*Patru et al., 2010, Thirant et al., 2011*).

Tableau 3: Liste des cultures de GSC utilisées. OB1 et TG1 ont été obtenues à partir de gliomes de l'adulte et TP84 à partir d'un gliome de l'enfant. * Les GSC TG1-miR-302-367 ont été dérivées des TG1 par transduction lentivirale du groupe de micro-ARN miR-302-367 (**Fareh et al, 2012**). Les mutations des gènes IDH1 et IDH2 sont caractéristiques des gliomes diffus de croissance lente de l'adulte (*Parsons DW et al., 2008 ; Yan H et al., 2009*). Elles ne sont pas présentes dans les gliomes de l'enfant quel que soit leur grade et leur sous-type histologiques (*Paugh et al., 2010*). Inversement, la mutation H3F3A se retrouve uniquement dans les gliomes pédiatriques (*Wu G et al., 2012 ; Schwartzenuber J et al., 2012*). WT : wild-type ou forme sauvage, non mutée du gène. IDH : isocitrate dehydrogenase. TP53 : tumor protein p53. PTEN : phosphatase and tensin homolog.

GSC culture name	Diagnosis according to WHO classification	Age	Sex	Location	Grade	Mutations				
						IDH1	IDH2	TP53	PTEN	H3F3A
OB1	Oligoastrocytoma	76	F	Fronto-temporal cortex	III	WT	WT	WT	WT	WT
TG1	Glioblastoma	68	M	Fronto-temporal cortex	IV	WT	WT	WT	WT	WT
TG1-miR-302-367	Glioblastoma*	68	M		IV	WT	WT	WT	WT	WT
TP84	Diffuse intrinsic pontine gliomas	9	M	Brainstem	III	WT	WT	R158G	WT	K27M

OB1 et TG1 proviennent de gliomes correspondant aux tumeurs glio-neurales malignes (TGNM) selon la classification de l'hôpital Sainte-Anne qui s'appuie sur l'analyse combinée des

données radiologiques et immunohistopathologiques (Varlet et al, 2005). Ces gliomes de haut grade sont notamment distingués par leur localisation préférentielle dans les zones superficielles du cortex et par l'expression par les cellules tumorales d'un marqueur du lignage gliale (GFAP) et du lignage neuronal (neurofilament). La lignée TG1-mir-302-367 (appelée par la suite GSC-miR-302-367) est une culture primaire dérivée de la lignée TG1 comme décrit précédemment (**Fareh M et al., 2012**). Elle a été établie dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Thierry VIROLLE (INSERM U898, Nice).

TP84 a été isolée à partir d'une forme particulièrement grave de gliome de l'enfant, les « diffuse intrinsic pontine glioma » ou DIPG. Elles constituent la forme la plus fréquente des tumeurs cérébrales pédiatriques de l'enfant et leur issue est toujours fatale. Ces tumeurs se développent dans le tronc cérébral, les cellules tumorales se dispersant au travers de tout le parenchyme cérébral (*Puget et al, 2012*). Cette dispersion, associée à leur localisation n'autorise pas les exérèses chirurgicales. Seules des biopsies sont parfois réalisées pour confirmer le diagnostic et les TP84 ont été obtenues à partir d'un fragment de biopsie.

2. Méthodes

2.1. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les cellules TG1 et TG1-miR-302-367 ont été fixées 10 minutes avec 0,5% de paraformaldéhyde afin d'établir des ponts covalents entre l'ADN et les protéines (dont les histones) qui lui sont associées (crosslink) (Zhang et al., 2009). Les ChIP ont été réalisés à l'aide du kit ChIP-IT Express d'Active Motif (voir protocole détaillé du ChIP en annexe 2). Brièvement, les cellules ont été lysées et le lysat soniqué avec un sonicateur afin de rompre la membrane nucléaire et de casser la chromatine en fragments de 200 à 500 paires de base (bp). Les anticorps (anti-triméthyl-H3-lys27/anti-H3K27me3 ou anti- triméthyl-H3-lys4/H3K27me3) ont été ajoutés aux lysats et incubés sur la nuit sous agitation. Les complexes anticorps-chromatine ont été immunoprécipités à l'aide de billes magnétiques recouvertes de protéine G. Une étape de « dépontage » (reverse crosslink) a permis de libérer la chromatine des protéines qui lui sont associées. Chaque échantillon immunoprécipité pour la préparation de la banque est le produit de trois immunoprécipitations réalisées à partir de cultures indépendantes. Les trois immunoprécipités ont été rassemblés avant d'être purifiés à l'aide des colonnes de Qiagen

MinElute en suivant les instructions du fabricant. La quantité de chromatine obtenue a été déterminée à l'aide du kit hsDNA Qubit (Invitrogen).

2.2. Séquençage à haut débit

Le séquençage a été réalisé par la plateforme MGX de Montpellier dirigée par Laurent Journot. La préparation de la banque (préparation des échantillons à séquencer) est faite à l'aide du kit DNA Seq sample prep (Kit d'Illumina) à partir de 20ng de chromatine immunoprécipitée. Cette étape consiste à liguer des adaptateurs aux extrémités des fragments d'ADN suivie d'une étape d'amplification permettant la sélection des fragments portant uniquement les adaptateurs. La qualité de la banque est validée grâce à une quantification (concentration et taille des fragments) de l'ADN sur puce Agilent DNA1000. La génération de clusters (population clonale de fragments d'ADN) et l'hybridation du primer de séquençage sont réalisées à l'intérieur d'une Flow-cell sur un appareil appelé cBot à l'aide du kit « cluster generation » d'Illumina. Le séquençage est réalisé sur un HiSeq 2000 d'Illumina grâce à la technique SBS (Sequence By Synthesis). Les analyses d'images sont réalisées avec le logiciel HiSeq Control Software (HCS) d'Illumina. Le basecalling est réalisé à l'aide du logiciel RTA (Illumina). Cette étape permet de corriger les intensités des signaux d'hybridation et de transformer les intensités en base nucléotidique. L'alignement des séquences obtenues sur le génome de l'Homme (hg19) est réalisé à l'aide du logiciel CASAVA (version 1.8.2, Illumina). Seules les fragments d'ADN séquencés, qui s'alignent de manière unique sur le génome sont conservés. La présence des marques H3K4me3 et H3K27me3 est alors repérée sur une fenêtre de +/- 20 kb en fonction des coordonnées de début et de fin des transcrits RefSeq fournies par NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) (Voir Annexe 1 partie séquençage, page 154 pour plus de détails). Cette première analyse est désignée ensuite sous le nom « ChIP-seq 20kb ». Une seconde analyse comportant une annotation plus stringente des gènes (fenêtre de 2kb autour du TSS) a été menée parallèlement à la première à titre de comparaison. Cette seconde analyse est désignée sous le nom « ChIP-seq 2kb ».

2.3. Analyse de l'expression des gènes

2.3.1 Préparation des ARN

L'extraction des ARN totaux des GSC et des GSC-miR-302-367 a été réalisée à l'aide du kit RNeasy Plus Universal (Qiagen) suivant les instructions du fabricant. Une purification

supplémentaire de l'ARN a été réalisée avec le kit RNase-Free DNase Set (Qiagen) dans le but d'éliminer toute trace d'ADN et obtenir une fraction pure d'ARN.

Transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire (reverse transcription or RT)

L'ADNc (ADN complémentaire) a été préparé en utilisant le kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen) (un mélange de PolyAdt et de random hexamers) suivant les instructions du fabricant. L'ADNc a été ensuite analysé par qPCR ou par puces à ADN (microarrays).

2.3.2. PCR quantitative (qPCR)

Pour chaque expérience de RT-qPCR (Reverse transcription quantitative PCR), 5ng d'ADNc a été mélangé avec 15µl de SYBR green Mix (Qiagen), les couples d'amorces d'intérêt (primer, 200nM chaque) et de l'H₂O stérile dans un volume final de 30µl. La réaction de PCR a été exécutée dans un Taqman 7500 Fast (95°C pendant 10 minutes; 40 cycles à 95°C pendant 15 sec, primer set-specific annealing temperature pendant 1 minute à 60°C, avec une étape finale de dénaturation à 95°C pendant 15 sec, 60°C durant 1 minute et 95°C durant 30 sec). Les amorces proviennent des compagnies Eurofins (France) et Taqman, Life technologies (France). Chaque échantillon a été normalisé sur la base du contenu en transcrits de *TBP* (TATA box-binding protein). Puis les échantillons contrôle (les GSC ou les siARN contrôle) ont été normalisés à 1 ou 100%.

2.3.3. Puces à ADN (microarray expression)

Le transcriptome des deux lignées (GSC et GSC-miR-302-367) à 3 passages cellulaires successifs, a été établi à l'aide de puces à ADN. Cette technique repose sur l'hybridation d'un jeu ordonné de molécules d'ADN fixées sur un support solide avec une sonde marquée (marquage radioactif ou fluorescent) préparée à partir de l'ARN extrait des cellules détaillées précédemment. Après lavage et exposition, une image d'hybridation est obtenue avec des signaux quantifiables, d'intensité variable selon les spots, représentant les niveaux variables d'expression du gène correspondant. Ces signaux sont ensuite normalisés en fonction d'une série de gènes « ménagers » (30 au total), et les résultats sont analysés et visualisés à l'aide d'outils bioinformatiques. Les transcriptomes ont été réalisés sur puce Affymetrix Exon1.0S et analysés avec l'assistance de la plateforme bioinformatique de la société GenoSplice Technology (Centre Hayem, Hôpital Saint-Louis, Paris, France). Une série de RT-qPCR menée

avec l'aide de l'équipe d'Yvan Bièche (UMR_S 745, Paris, France) a été réalisée sur un sous-groupe de transcrits afin de vérifier la validité des résultats issus des hybridations des puces à ADN et des ChIPs.

2.4. Analyses des ChIP-seq et du transcriptome

Chacune des analyses des ChIP-seq 20kb et 2kb a permis l'extraction de 4 listes constituées des gènes portant les marques H3K4me3 ou H3K27me3 dans les lignées GSC ou GSC-miR-302-367 : GSC/H3K4me3, GSC/H3K27me3, GSC-miR-302-367/H3K4me3, GSC-miR-302-367/H3K27me3. Ces analyses ont été menées avec l'assistance du Dr François-Xavier Lejeune (bioinformaticien de l'équipe de biologie et pathologie du neurone dirigée par Dr C. Néri, Inserm U894, Paris). L'étude des listes obtenues à partir des ChIP-seq 20kb et 2kb ainsi que l'analyse conjointe avec les résultats du transcriptome ont été obtenues à l'aide des fonctions d'analyse statistique et graphiques du logiciel R version 2.15.1 (<http://cran.r-project.org/>).

2.4.1. Répartition des gènes selon leur association avec les marques d'histone H3K4 et H3K27 dans les analyses ChIP-seq

Pour chacune des analyses ChIP-seq, deux camemberts (Figures 2 et 4 des résultats expérimentaux) décrivent pour chaque lignée la représentation des gènes présentant une des deux marques H3K4me3 ou H3K27me3, les deux marques simultanément (bivalents) et des gènes ne portant aucune des marques étudiées (none).

2.4.2. Comparaison des ChIP-seq avec l'analyse transcriptomique

A partir de l'analyse transcriptomique, nous étudions la corrélation entre le niveau d'expression des gènes dans les deux lignées GSC et GSC-miR-302-367 et l'association aux marques détectée dans les analyses ChIP-seq (Figure 7 pour l'analyse ChIP-seq 20kb, Figure 8 pour les analyses ChIP-seq 20kb et 2kb). Pour chacune des lignées, une représentation en boxplots permet de visualiser et de comparer la distribution des valeurs d'expression pour les listes de gènes présentant une des deux marques H3K4me3 ou H3K27me3, les gènes bivalents et les gènes none. Le boxplot ALL représente la distribution de référence des valeurs d'expression pour l'ensemble des gènes du transcriptome.

Un boxplot (ou boîte à moustaches) donne une représentation graphique de la distribution d'une série de données sous la forme d'une boîte représentant l'écart interquartile délimitée par les 1^{er} quartile Q1 (25%) et 3^{ème} quartile Q3 (75%) encadrant la médiane (trais épais). L'extrémité de la moustache inférieure est la valeur minimum dans les données qui est supérieure à la valeur frontière basse $Q1 - 1,5 * (Q3 - Q1)$. L'extrémité de la moustache supérieure est la valeur maximum dans les données qui est inférieure à la valeur frontière haute $Q3 + 1,5 * (Q3 - Q1)$. Les points situés au-delà des extrémités des moustaches représentent des valeurs extrêmes (minimales ou maximales) de la série.

La différence des moyennes de distribution pour les 4 listes et la liste ALL a été validée par un test one-way ANOVA.

2.4.3. Profils d'expression de l'analyse transcriptomique

La heatmap illustre les modifications de l'expression des gènes mesurées sur la bio-puce (« microarray ») à partir des ARNm extraits des cultures de GSC TG1 et TG1-miR-302-367. La variation de couleurs de la heatmap fait apparaître l'intensité des signaux d'hybridation des 6 échantillons (3 réplicats GSC et 3 réplicats GSC-miR-302-367). Ce graphique permet de comparer le niveau d'expression des gènes entre les deux lignées GSC et GSC-miR-302-367 et de visualiser une classification hiérarchisée des transcrits présentant des profils d'expression similaires au travers des deux lignées. Trois heatmaps ont été produites pour l'intégralité du transcriptome (Figure 6A), pour les transcrits présentant une amplitude de variation (fold change) d'expression entre les deux lignées en \log_2 supérieure à 1,5 et statistiquement significative ($p\text{value} \leq 0,05$) (Figure 6C) et pour une sous-liste reprenant les 500 transcrits les plus différenciellement régulés entre les deux lignées (Figure Supplémentaire 1). Les heatmaps ont été produites à l'aide du package « pheatmap » de R.

2.4.4. Analyse du changement des profils H3K4me3 et H3K27me3 accompagnant la perte des propriétés souches et tumorigènes des GSC

Partant des 4 listes de l'analyse ChIP-seq 20kb, nous avons produit 8 sous-listes : 4 sous-listes pour les gènes portant la marque H3K4me3 uniquement dans les GSC, uniquement dans les GSC-mir, dans les 2 lignées ou dans aucune des 2 lignées et 4 sous-listes obtenues de la même façon pour les gènes portant la marque H3K27me3. Le croisement des 4 sous-listes « H3K4me3 » et des 4 sous-listes « H3K27me3 » a permis de générer 16 sous-listes résumant l'appartenance ou non des gènes aux marques « H3K4me3 » et/ou « H3K27me3 » ainsi qu'aux

2 lignées GSC et GSC-miR. La représentation du nombre de gènes des 16 sous-listes est donnée par le diagramme de Venn (Figure 9A).

2.4.5 Analyse fonctionnelle : Gene Ontology (Go term)

L'analyse fonctionnelle du ChIP-seq (ici seulement ChIP-seq 20kb) porte sur des regroupements des 16 sous-listes à l'aide d'un test d'enrichissement des termes GO (Gene Ontology) effectué contre la liste totale des gènes analysés dans le ChIP-seq. Deux analyses GO ont été réalisées à l'aide de 2 outils bioinformatiques : la base en ligne DAVID (**D**atabase for **A**nnotation, **V**isualization and **I**ntegrated **D**iscovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) et la package R/Bioconductor « TopGO » (<http://www.bioconductor.org/>). Pour chaque liste, un diagramme en bâtons horizontal (barchart) (Figures 10, 11 pour DAVID et Figure Supplémentaire 2 pour TopGO) montre les termes GO les plus enrichis. Les termes GO sont représentés sur l'axe des ordonnées et la P-valeur indiquant l'importance de l'enrichissement (présenté en $-\log_{10}$) est sur l'axe des abscisses. TopGO et DAVID permettent de mettre en évidence les fonctions biologiques les plus représentatives des listes de gènes étudiées. Ces fonctions peuvent être associées par exemple à de larges fonctions biologiques telles que la régulation de la mort cellulaire ou la transcription.

D'autre part, nous avons croisé la liste des gènes qui changent au sein des GSC-miR avec la liste des facteurs de transcription (Homo Sapiens eukaryotic type) de la base KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>), représenté par un réseau à l'aide du programme STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, <http://string-db.org/>).

2.5. Viabilité et prolifération cellulaires par test d'exclusion du bleu Trypan

La viabilité et la prolifération cellulaires ont été déterminées en utilisant le test d'exclusion du bleu Trypan (Sigma, 0.1% v/v, incubation 5min à température ambiante). Les cellules bleues et blanches (mortes et vivantes, respectivement) ont été comptées avec un microscope optique inversé à contraste de phase Nikon-TMS.

2.6. Western Blot

Les cellules (1 million) ont été récoltées par centrifugation (230g, 5 min) et rincées en PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4). Le culot cellulaire a été lysé dans un tampon de lyse RIPA (50mM tampon Tris-HCl pH 6.8 contenant 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 0.5mM EGTA, 0,5mM EDTA, 50mM β -Glycérophosphate, 1mM Na⁺ Orthovanadate, 5 μ g/ μ l leupeptine, 5 μ g/ μ l aprotinine, 5 μ g/ μ l pepstatine et 1mM PMSF). Les protéines ont été dosées par une méthode colorimétrique avec le kit BCA (BiCinchoninic Acid) (Pierce, Biotechnology). Les extraits protéiques (25 μ g) ont été séparés par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) et transférés sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C Extra, Amersham) comme décrit (Thirant et al, 2012). Les anticorps suivants ont été utilisés pour les Western blot : anti-Actin (Millipore Chemicon, 1:10000), anti-Arnt2 (Santa Cruz, 1:2000), anti-Histone H3 (Abcam, 1 :50000), anti-triméthyl-histone H3 (Lys 4) (Cosmobio, 1:500), anti-triméthyl-histone H3 (Lys 27) (Upstate-Millipore, 1:3000). Les anticorps secondaires couplés à la HRP (horseradish peroxidase) utilisés sont les suivants : anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, 1:10000), anti-rabbit IgG (BioRad, 1:10000). La détection du signal a été menée à l'aide du kit de chimioluminescence Western Lightning Plus ECL (Perkin Elmer). L'analyse densitométrique a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

2.7. Immunocytochimie

Les cellules ont été récoltées, lavés au PBS, étalées sur des lames de verre (SuperFrost, Fischer Scientific), et incubées 20min à -20°C dans du méthanol pré-refroidi à -20°C. Après fixation, les cellules ont été incubées dans du PBS (15 min, 23°C), et incubées 30min à température ambiante dans une solution de PBS contenant 5% de BSA (bovine serum albumin, Sigma), 3% de SVF (serum de veau fetal, Gibco Invitrogen) et 0,5% de saponine (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été exposées pendant la nuit à 4°C aux solutions d'anticorps primaires dilués dans du PBS contenant 0,3% de BSA et 0,5% de saponine (anti-Arnt2 1:50, Santa Cruz Biotechnology ; anti-Nanog 1 :50, R&D). Les anticorps secondaires, dilués dans le même diluant que les anticorps primaires, ont été incubés 1h à température ambiante (anti-goat Alexa Fluor ® 555, 1:500, Invitrogen Molecular probes et anti-rabbit Alexa Fluor ® 488, 1:500, Invitrogen Molecular probes). Les marquages immunofluorescence ont été visualisés avec un microscope fluorescent Axioplan et les images capturées en z-stack (obtenir des images de plans à différentes profondeurs dans l'échantillon) à l'aide de l'ApoTome (Zeiss, <http://www.zeiss.fr/micro>), de la caméra digitale AxioCam MRm, et du logiciel AxioVision 4.6.3.

Les images ont été acquises et préparés à l'aide du logiciel Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, <http://www.adobe.com>).

2.8. Transfection des siARN

La transfection des cellules a été réalisée avec l'Amaza nucleofector electroparator (Amaza Biosystems) suivant les instructions du fabricant. L'électroporation a été menée dans une solution de transfection L (Amaza) à l'aide du programme de transfection X-005 pour les OB1 et A-020 pour les TP84. Les GSC OB1 et TP84 ont été transfectées par électroporation avec 250nM du siARN Scrambled (Ambion ® Silencer Negative Control, Cat#AM4611), utilisé comme contrôle, ou avec un mélange de 2 siARN (125nM chacun) ciblant ARNT2 (Ambion ® Cat# 4392420, ID S19227 et Santa Cruz sc-29735). Les cellules ont été récoltées 6 jours après la transfection. Elles ont été ensuite lysées pour une extraction de protéines, pour une extraction d'ARN ou pour une mesure de la luciférase (voir section suivante n°2.9).

2.9. Dosage de la luciférase par des gènes rapporteurs

La quantification de l'activité luciférase Firefly et Renilla a été réalisée à l'aide du système Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega), suivant les instructions du fabricant. La luciférase Renilla a été utilisée pour une normalisation interne des valeurs de l'activité Firefly. Les plasmides utilisées sont les suivants : plasmide pGF-CMV-luc (plasmide vide), plasmide pGF-CMV-HIF1 α -luc (plasmide avec des « enhancer response elements » reconnus par HIF1 α), plasmide pGL4-luc (plasmide vide), plasmide pGL4-Nanog-luc (plasmide avec des « enhancer response elements » reconnus par Nanog), plasmide pGL3-luciférase (plasmide vide), plasmide pGL3-Sox2-luciférase (plasmide avec des « enhancer response elements » reconnus par Sox2) et le plasmide pRL (renilla). Les cellules ont été transfectées par électroporation comme indiqué ci-dessus, avec les siARN (Jour 0) puis avec les plasmides au jour 5. La mesure de l'activité luciférase Firefly et Renilla s'est effectuée 24h après, soit au jour 6.

2.10. Statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de leur moyenne et de leur déviation standard (SD). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du programme GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software) et des packages de base du logiciel R (voir détail dans partie concernée). Les résultats pour lesquels $p < 0.05$ sont considérés comme statistiquement significatifs (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). Toutes les expériences ont été répétées au moins trois fois de façon indépendante.

Résultats expérimentaux

**Partie 1 : Isolation et caractérisation des cellules souches
cancéreuses dérivées des gliomes pédiatriques**

A. Introduction à l'étude menée

Les gliomes de l'enfant sont rares, mais demeurent dévastateurs. Contrairement aux gliomes de l'adulte, on sait peu de choses sur les mécanismes qui sous-tendent leur développement. En effet, il existe une proportion élevée de gliomes de l'enfant pour lesquels les informations histologiques manquent souvent en raison des dangers de la biopsie dans la plupart des régions du cerveau touchée par la tumeur (comme le tronc cérébral qui contrôle beaucoup de fonctions vitales). Malgré les différences épidémiologiques entre gliome de l'enfant et de l'adulte, les systèmes de classification actuels ne permettent pas leur distinction pour un diagnostic spécifique basé sur l'âge des patients. Encore plus grave, les traitements des gliomes de l'enfant sont basés sur les données de l'adulte sans prise en considération des différences biologiques entre les deux types de tumeurs.

Bien que les premiers travaux sur les cellules souches cancéreuses des tumeurs cérébrales aient été menés sur des tumeurs pédiatriques (*Hemmati, 2003*), aucune étude n'avait tenté de déterminer la présence de GSC dans les différents types de gliomes pédiatriques. L'équipe s'est donc appuyée sur l'expérience acquise lors de ses recherches sur les cellules souches cancéreuses des gliomes de haut-grade de l'adulte pour réaliser une recherche de GSC à partir d'un large panel de gliomes pédiatriques de différents types et grades. Cette étude a été possible grâce à la collaboration du service de neurochirurgie de l'hôpital Necker (Paris, France) dirigé par le Prof. Christian Sainte-Rose, des oncopédiatres de l'équipe du Dr Jacques Grill (Institut du cancer de l'hôpital Gustave Roussy, Villejuif, France) et du service de neuropathologie de l'hôpital Sainte-Anne alors dirigé par le Prof. Catherine Daumas-Duport.

L'objectif à long terme de ce travail était de fournir des outils permettant la progression de notre compréhension de la physiopathologie des gliomes pédiatriques. Dans le cadre de ce travail, j'ai pris en charge la caractérisation des effets de différents modes de culture sur la croissance des cellules souches cancéreuses isolées.

B. Article n°1

Clinical Relevance of Tumor Cells with Stem-Like Properties in Pediatric Brain Tumors

Cécile Thirant^{1,9}, Barbara Bessette^{1,9}, Pascale Varlet^{1,2,9}, Stéphanie Puget^{3,4,9}, Josette Cadusseau⁵, Silvina Dos Reis Tavares¹, Jeanne-Marie Studler^{1,6}, David Carlos Silvestre⁷, Aurélie Susini⁸, Chiara Villa^{1,2}, Catherine Miquel^{1,2}, Alexandra Bogeas¹, Anne-Laure Surena¹, Amélia Dias-Morais¹, Nadine Léonard^{1,2}, Françoise Pflumio⁹, Ivan Bièche⁸, François D. Boussin⁷, Christian Sainte-Rose³, Jacques Grill⁴, Catherine Daumas-Duport^{1,2}, Hervé Chneiweiss¹, Marie-Pierre Junier^{1,2*}

1 Inserm, UMR894, Team Glial Plasticity, University Paris Descartes, Paris, France, **2** Department of Neuropathology, Hospital Sainte-Anne, Paris, France, **3** Pediatric Neurosurgical Department, Hospital Necker, University Paris Descartes, Paris, France, **4** CNRS UMR 8203, Vectorology and Anticancer Therapeutics, Gustave Roussy Cancer Institute, Villejuif, France, **5** Inserm U955, Team 10, University of Paris 12, Créteil, France, **6** Collège de France, Paris, France, **7** Laboratoire de Radiopathologie UMR 967, CEA-INSERM-Université Paris VII, Fontenay-aux-Roses, France, **8** Laboratoire d'Oncogénétique - INSERM U735, Institut Curie/Hôpital René Huguenin, St-Cloud, France, **9** Laboratoire des Cellules Souches Hématopoïétiques et Leucémiques, UMR U967, CEA-INSERM-Université Paris VII, Fontenay-aux-Roses, France

Abstract

Background: Primitive brain tumors are the leading cause of cancer-related death in children. Tumor cells with stem-like properties (TSCs), thought to account for tumorigenesis and therapeutic resistance, have been isolated from high-grade gliomas in adults. Whether TSCs are a common component of pediatric brain tumors and are of clinical relevance remains to be determined.

Methodology/Principal Findings: Tumor cells with self-renewal properties were isolated with cell biology techniques from a majority of 55 pediatric brain tumors samples, regardless of their histopathologies and grades of malignancy (57% of embryonal tumors, 57% of low-grade gliomas and neuro-glial tumors, 70% of ependymomas, 91% of high-grade gliomas). Most high-grade glioma-derived oncospheres (10/12) sustained long-term self-renewal akin to neural stem cells (>7 self-renewals), whereas cells with limited renewing abilities akin to neural progenitors dominated in all other tumors. Regardless of tumor entities, the young age group was associated with self-renewal properties akin to neural stem cells ($P=0.05$, chi-square test). Survival analysis of the cohort showed an association between isolation of cells with long-term self-renewal abilities and a higher patient mortality rate ($P=0.013$, log-rank test). Sampling of low- and high-grade glioma cultures showed that self-renewing cells forming oncospheres shared a molecular profile comprising embryonic and neural stem cell markers. Further characterization performed on subsets of high-grade gliomas and one low-grade glioma culture showed combination of this profile with mesenchymal markers, the radio-chemoresistance of the cells and the formation of aggressive tumors after intracerebral grafting.

Conclusions/Significance: In brain tumors affecting adult patients, TSCs have been isolated only from high-grade gliomas. In contrast, our data show that tumor cells with stem cell-like or progenitor-like properties can be isolated from a wide range of histological sub-types and grades of pediatric brain tumors. They suggest that cellular mechanisms fueling tumor development differ between adult and pediatric brain tumors.

Citation: Thirant C, Bessette B, Varlet P, Puget S, Cadusseau J, et al. (2011) Clinical Relevance of Tumor Cells with Stem-Like Properties in Pediatric Brain Tumors. PLoS ONE 6(1): e16375. doi:10.1371/journal.pone.0016375

Editor: Donald Gullberg, University of Bergen, Norway

Received: August 12, 2010; **Accepted:** December 19, 2010; **Published:** January 28, 2011

Copyright: © 2011 Thirant et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by Institut National du Cancer (INCa), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), and the Ile de France Cancer stem cell network (grants INCa/ARC and INCa-CSC network Ile-de-France), the Région Ile-de-France (study fellowships to CT and AB), and the Fondation pour la Recherche Médicale (study fellowships to ALS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: marie-pierre.junier@inserm.fr

 These authors contributed equally to this work.

Introduction

Primitive brain tumors are neoplasms of varied histopathological appearance that affect both adults and children [1,2]. The prognosis of their most malignant forms remains poor despite development of combined therapeutic treatments. Research in

cell biology and gene expression studies have provided support for the idea that tumor stem cells (TSCs), a subpopulation of cancer cells that differ from the other cancerous components by their properties similar to either neural progenitors or neural stem cells, and their peculiar resistance to current therapeutics [3–5], account for the origin, development and therapeutic resistance of

brain tumors. Until now, TSCs have been consistently characterized only from a limited number of brain tumor types, essentially glioblastomas in adults and medulloblastomas in adults and children [6–13]. They form oncospheres in defined medium, which self-renew. Two types of TSCs have been isolated: TSCs that like neural stem cells have extended self-renewal properties, and TSCs that like neural progenitors or transit amplifying cells are endowed with a limited self-renewal capability. For example, TSCs isolated from pediatric and adult medulloblastomas [8,9] differ from their counterparts isolated from adult high-grade gliomas by their limited self-renewal potential, which is closer to that of neural progenitors than to that of neural stem cells [7,12,14,15]. Coherently, studies of murine medulloblastomas have shown that cerebellar progenitors are the cell of origin of these high-grade embryonal tumors [16]. TSCs share also with neural progenitors and/or neural stem cells several molecular markers [6,8,9,17], and generate *in vivo* a phenocopy of the tumor from which they derive [9,11,17]. Experimental demonstrations that either mature glial cells having undergone a de-differentiation process [18] or that neural stem cells or neural progenitors [19,20] may behave as the cell of origin of brain tumors suggest that most of these neoplasms could contain TSCs, regardless of their cell of origin. Independent laboratories have reported isolation of TSCs from a majority of adult high-grade brain tumors they assayed, either glioblastomas or malignant glioneuronal tumors (MGNT) [6–11,13]. Data are less numerous in children, and the different physiopathological properties exhibited by pediatric and adult brain tumors [21–24] limit the extrapolation of data obtained in one group of age to the other. In children, tumor cells with neural progenitor-like features have been isolated from medulloblastomas and ependymomas [25], and TSCs have been well characterized from a few cases of low- and high-grade gliomas [7,12].

To determine the extent to which TSCs are a general component of primitive brain tumors, or are specific of certain tumor types, we performed a comparative study using a large sample of fifty-five pediatric brain tumors of various categories and grades of malignancy. The current controversies surrounding the criteria defining TSCs [11,26–31], and the limited amount of data on TSCs from pediatric brain tumors led us to apply cell culture paradigms that reveal the properties of tumor cells with *no a priori* inference of the cell function from its surface markers [9,12]. Indeed, no consensus has been achieved regarding membrane markers specific to adult glioma-derived TSCs, their expression varying among tumor samples and/or depending on environmental signals [11,26–28]. We also paid special attention to the two TSC properties consistently shown throughout the extensive literature devoted to the subject, i.e. capacity of the cells to grow under the form of oncospheres and to self-renew either in a limited or extended manner.

Our data show that tumor cells with self-renewal properties and markers of neural progenitors and neural stem cells can be isolated from a majority of pediatric brain tumors regardless of their histopathological subtypes and grades of malignancy.

Materials and Methods

Ethics statement

The biological study was approved by the Internal Review Board of the Biological Resource Center of the Necker Sick Children Hospital in Paris. Tumor samples were obtained after signed informed consent from the parents of children who underwent surgery at Necker hospital from February 2007 to June 2009.

Sample collections and isolation of brain tumor cells

Tumor samples were cut into 1 mm³ pieces and placed into either RPMI buffer for immediate processing or into freezing medium (90% serum, 10% DMSO) prior to being progressively cooled to –80°C.

Cell dissociation was performed enzymatically [7,11] or mechanically. All of the methods employed resulted in similar cell survival rates (range, 27–95%). Fresh or frozen biopsies yielded similar rates of viable cells. Cells were plated at 5×10⁴ cells/cm² in either house-made [11] or NSA-H medium (Stem Cell, France) with 10 ng/ml FGF, 20 ng/ml EGF, and 1 μg/ml Heparin [32]. Viable cell numbers varied from 2×10⁵ to 2×10⁷ in relation to the sample size. The cells were further cultured until appearance of floating cellular spheres. Half of the culture medium was renewed each week. The ability of cells forming spheres to generate novel spheres over successive passages was evaluated through seeding the individual cells at low densities (10⁴ cells/cm²), starting when the spheres reached a minimum 100 μm diameter as described [32]. One self-renewal was scored when the numbers of 100 μm diameter floating spheres counted under phase contrast microscopy were at least two-fold more abundant than in the previous passage. The reported limited self-renewal capacity (≤5) of tumor-initiating cells isolated from human pediatric medulloblastomas [9,12], and the converse ability of mouse and human neural stem cells to sustain at least seven self-renewals [14,15] (see also supplementary information on human fetal neural stem cells), led us to distinguish cells with a self-renewal ability of two to seven doublings, from those with a self-renewal ability greater than seven. Once the cultures stabilized, the spheres were routinely dissociated once a week and plated at 10⁶ cells/75 cm²/10 ml. Clonal properties were assessed by seeding in 96-well plates at 1–2 cells/well or in methylcellulose containing medium as previously described [14]. The characterization of human fetal neural stem cells is provided in the supplementary data and in Figure S1.

Molecular profiling

Flow cytometry analysis of cell surface antigens CD15 and CD133 was performed as previously described [11]. Immunocytochemical and immunohistochemical procedures and image acquisition were performed as previously described [18,33] (Table S1). Real-time quantitative RT-PCR (qPCR) was performed as previously described [34], with each sample normalized on the basis of its content in transcripts of the TATA box-binding protein, *TBP*. Results of target gene expression are presented as *Ntarget* values ($N_{target} = 2^{Ct_{sample} - Ct_{TBP}}$, *Ct* cycle threshold), which were subsequently further normalized such that the mean of the cortectomies (CX) *Ntarget* values was 1. The nucleotide sequences of primers for *TBP* and target genes are available upon request.

CGH array, and mutation analyses of p53

The karyotype of the isolated cells was analyzed at the Agilent Platform of the Cancer research institute of Lille (University of Lille 2, IFR 114, France) using Agilent 4X180K human CGH microarrays and by Integragen society (France) using human cytoSNP-12 microarrays from Illumina. The microarray data related to this paper have been submitted to the Array Express data repository at the European Bioinformatics institute (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) under the accession numbers E-MEXP-2909 and E-MEXP-2910 and are MIAME compliant. DNA and RNA were extracted from pediatric gliomas cultures with DNAeasy and RNeasy Mini Kit (Qiagen, France). DNA fragments were generated by reverse transcription (RT) of total

RNA in a final volume of 25 μ l using random primers and M-*MLV Reverse Transcriptase* (Promega, France). PCR was performed by using 1 μ l of the RT reaction and Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, France). The primers were designed to overlap *TP53* exons 4/5 (5'-CTGTGACTTGCAGC-TACTCC3') and exons 8/9 (5'-TTGGGCAGTGCCTCGCTTA-GT3'). The thermocycling conditions were 5 min at 94°C for enzyme activation, followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 60°C for 1 min, 68°C for 1 min. The PCR products (568 bp length) were purified and sequenced (Biofidal, France).

Grafts

Mechanically dissociated oncospheres (1–2 10^4 cells/ μ l PBS-glucose buffer) were grafted within the right striatum of 6- to 7-week-old male nude mice (Charles River, France) or 2-month-old male NOD-SCID-ILR2^{-/-} (NSG) mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) (1.5–2 μ l/graft i.e. 1.5–4 10^4 cells/graft). The *in situ* development of the oncospheres was analyzed as previously described [18,33].

Response to genotoxic stress

Spheres were dissociated, seeded at 10^4 cells/100 μ l/vial, and cultured 24 hours prior to 5 Gy γ -radiation as previously described [18]. Cells seeded at 2×10^4 cells/100 μ l/vial were treated with 500 μ M temozolomide (Interchim, AM195, France) or its vehicle DMSO. Cell viability was evaluated with the Cell Proliferation Reagent WST-1 kit following the manufacturer's instructions (Roche, France).

Statistical analysis

Overall survival was calculated from the time of surgery to death or time of last follow-up appointment for surviving patients. Chi-square tests were performed to test the significance of clinical differences between subtypes. Kaplan-Meier analyses were performed for survival data using the log-rank test. The Cox model was used to study prognostic factors on overall survival. Univariate and multivariate analyses were performed for both the whole series and after exclusion of the low-grade tumors. All P-values were two sided, and $P < 0.05$ was considered significant. Analyses were performed using SPSS 16.0 for Windows.

Results

Tumor and patient characteristics

Tumors were classified following the WHO classification [1] and the Sainte-Anne Hospital classification [35] when applicable (Table 1). Most tissue samples were obtained from newly diagnosed tumors, with the following exceptions: TP9, TP38, and TP82 (chemotherapy prior surgery) and TP45 (chemo-radiotherapy prior surgery). Cultured samples were excluded from the analysis when neuropathological examination showed widespread areas of necrosis, paucity of tumor cells, or signs of per-operating coagulation. Non-tumoral cerebral samples taken at distance from a cavernoma and from non-infiltrating tumors were used as controls. Fifty-five tumor samples were obtained from 52 patients (3 of them having been submitted twice to surgery). The median age of the cohort was 7.8 years (range, 1.2–15.5). During a median follow-up of 1.8 years (range, 0.1–3), 11 patients died. There was no association between age group (above and below median age) and histopathological subtypes. All patients with high-grade tumors received post-operative chemotherapy or radiotherapy, whereas those with low-grade tumors were treated with surgery alone.

Self-renewal abilities distinguish progenitor-like and stem-like tumor cells

Cells derived from non-tumoral tissues did not form floating spheres and did not survive beyond 1.5 months. In contrast, floating cellular spheres (hence after designed as oncospheres) were observed in 49/55 tumor cultures (Figure 1 and Figure S2). Only part of the cultures containing oncospheres exhibited self-renewal capabilities (Figure 1, left panel). Twelve of the 55 tumors yielded cells forming spheres that upon dissociation either did not generate novel spheres or generated spheres in numbers smaller than or similar to the ones evaluated in the previous passage. In those cases, sphere formation was likely to result from cell aggregation. Such a situation was encountered for both low and high malignant tumors (Figure S2). Importantly, cells forming spheres without self-renewal properties did not form tumors *in vivo* (see below).

Self-renewal properties were then assessed through evaluating for each individual culture the numbers of secondary spheres generated by dissociated cells at each passage. One self-renewal was scored when the numbers of secondary spheres doubled, as compared to the previous passage. Cells with limited self-renewal properties yielded secondary spheres at least twice but less than 7 times. Cells with extended self-renewal properties exhibited at least 7 self-renewals (see the Material and Methods section). We observed a strong association between the type of self-renewal properties (either limited like neural progenitors or extended like neural stem cells) and the histopathological subtypes ($P = 0.002$, chi-square test, Figure 1, right panel). All medulloblastoma-derived oncospheres exhibited the limited self-renewal abilities of progenitor-like cells (Figure 1 and Figure S3). Cells with progenitor-like self-renewing properties dominated in low-grade gliomas and neuro-glial tumors, whereas high-grade gliomas yielded essentially cells with extended self-renewal properties (Figure 1 and Figure S3). Among these tumor types, isolation of cells with self-renewal properties akin to neural stem cells was associated with malignant status ($P = 0.014$, chi-square test, Figure 1). Regardless of tumor entities, the young age group was associated with self-renewal properties akin to neural stem cells ($P = 0.05$, chi-square test).

In physiological situations, only neural stem cells and, to a lesser extent, neural progenitors form colonies in a semi-solid medium or when cultured under limiting dilutions [14]. Clonal cell frequencies were assayed using these assays on nine cultures of pediatric tumors. They ranged from 0.07% (for a ganglioglioma culture containing floating spheres that did not self-renew) to 86% (for an oligoastrocytoma III culture) (Figure S4). This wide range of frequency of oncosphere-forming cells was similar to those reported in previous studies of adult brain tumor TSCs [7,9,25].

High-resolution oligonucleotide array-CGH analysis showed that cells forming spheres exhibited severe chromosomal aberrations in each of the cultures examined (Figure S5). In addition, we identified distinct point mutations of the *TP53* gene in oncospheres derived from four tumor samples: TP54 (R248Q), TP59 (R273C), TP80 (R273H), and TP84 (R158G). Survey of p53 nuclear immunoreactive signal accumulation, a *TP53* mutation surrogate [36], was performed in a subset of the original tumor panel using the surgical samples preserved for histo-pathological analysis. The results showed $\geq 50\%$ p53-immunoreactive cells in 7/10 high-grade gliomas (Table S2), in accordance with reported frequencies of *TP53* mutations in pediatric malignant gliomas [37].

In summary, cells demonstrating ability to form self-renewing oncospheres were obtained in 37 of the 55 pediatric brain tumors studied. They were observed in the majority of tumors within each broad histopathological and grade categories studied. All cultures containing cells with limited self-renewal properties stopped proliferating within 5 months on average. Of note, only 30% of

Table 1. Tumor and patient characteristics.

NAME	DIAGNOSIS	AGE	SEX	LOCATION	SURGERY
NON TUMORAL TISSUE					
TP27	Non tumoral part of a cavernoma	13	M	Parietal lobe	Resection
TP30S	Non tumoral part of a pilocytic astrocytoma	2	M	Optical pathway	Resection
TP31	Non tumoral lesion	4	F	Brainstem	Biopsy
TP32S	Non tumoral part of a Choroid Plexus papilloma	3	M	Posterior fossa	Resection
EMBRYONAL TUMORS					
TP4	Medulloblastoma	9	M	Posterior fossa	Resection
TP6	Medulloblastoma	1.3	M	Posterior fossa	Resection
TP21	Medulloblastoma	6	M	Posterior fossa	Resection
TP36	Medulloblastoma	13	M	Posterior fossa	Resection
TP37	Medulloblastoma	7	M	Posterior fossa	Resection
TP38	Medulloblastoma ¹	9	F	Posterior fossa	Resection
TP22	Atypical Teratoid/Rhabdoid tumor	8	M	Parietal lobe	Resection
LOW-GRADE GLIAL AND NEURO-GLIAL TUMORS					
TP9	Pilocytic Astrocytoma	6	M	Intra-lateral ventricle and optical pathway	Resection
TP30T	Pilocytic Astrocytoma ¹	2	M	Optical pathway	Resection
TP34	Pilocytic Astrocytoma	2	F	Optical pathway	Resection
TP39	Pilocytic Astrocytoma	13	F	Posterior fossa	Resection
TP47	Pilocytic Astrocytoma	2	M	Posterior fossa	Resection
TP53	Pilocytic Astrocytoma	15	M	Spinal cord	Resection
TP55	Pilocytic Astrocytoma ¹	3	F	Optical pathway	Resection
TP57	Pilocytic Astrocytoma ¹	12	M	Posterior fossa	Resection
TP58	Pilocytic Astrocytoma	2	M	Optical pathway	Resection
TP73	Pilocytic Astrocytoma ¹	6	F	Posterior fossa	Resection
TP78	Pilocytic Astrocytoma	5	F	Hypothalamus	Resection
TP79	Pilocytic Astrocytoma	1.5	M	Posterior fossa	Resection
TP81	Pilocytic Astrocytoma	14	M	Intraventricular nodule	Resection
TP10	Ganglioglioma	1.8	M	Hypothalamus	Resection
TP12	Ganglioglioma ¹	5	F	Cerebellar peduncle	Resection
TP14	Ganglioglioma ¹	13	F	Temporal lobe	Resection
TP28	Ganglioglioma	9	M	Frontal lobe	Resection
TP35	Ganglioglioma	12	F	Posterior fossa	Resection
TP43	Ganglioglioma anaplastic	13	M	Parieto-occipital lobe	Resection
TP60	Ganglioglioma	13	M	Posterior fossa	Resection
TP68	Ganglioglioma	7	M	Cerebellar peduncle	Resection
TP77	Ganglioglioma or Dysembryoplastic neuroepithelial tumor	11	M	Temporal lobe	Resection
TP2	Angiocentric NeuroEpithelial Tumor (Oligodendroglioma A)	15	M	Temporal lobe	Resection
TP11	Angiocentric NeuroEpithelial Tumor	2	M	Frontal lobe	Resection
TP54	Fibrillary Astrocytoma II (Oligodendroglioma A)	9	M	Brainstem	Biopsy
TP17	Oligoastrocytoma II (Oligodendroglioma A)	6	F	Brainstem	Biopsy
EPENDYMOMA					
TP8	Ependymoma III	9	M	Frontal lobe	Resection
TP16	Ependymoma III	5	M	Frontal lobe	Resection
TP20	Ependymoma III	7	M	Posterior fossa	Resection
TP45	Ependymoma III	8	M	Cerebellar peduncle	Resection
TP48	Ependymoma III	13	M	Posterior fossa	Resection
TP56	Ependymoma III	2	F	Posterior fossa	Resection
TP62	Ependymoma III	2	M	Parietal lobe	Resection
TP64	Ependymoma III	2	M	Parieto-occipital lobe	Resection
TP65	Ependymoma III	11	F	Posterior fossa	Resection

Table 1. Cont.

NAME	DIAGNOSIS	AGE	SEX	LOCATION	SURGERY
TP76	Ependymoma II	10	F	Posterior fossa	Resection
HIGH-GRADE GLIAL TUMORS					
TP13	Astrocytoma III (Oligoastrocytoma A)	10	M	Brainstem	Biopsy
TP59	Astrocytoma III (Oligoastrocytoma B)	13	M	Thalamus	Resection
TP80	Astrocytoma III (Infiltrating glioma)	5	F	Brainstem	Biopsy
TP7	Oligoastrocytoma III (MGNT)	8	M	Thalamus	Resection
TP25	Oligoastrocytoma III ¹ (MGNT)	8	M	Thalamus	Resection
TP44	Oligoastrocytoma III (MGNT)	10	M	Brainstem	Biopsy
TP83	Oligoastrocytoma III (Infiltrating glioma)	5	F	Brainstem	Biopsy
TP84	Oligoastrocytoma III (Oligoastrocytoma B)	9	M	Brainstem	Biopsy
TP52	Oligodendroglioma III ¹ (Oligodendroglioma B)	13	F	Intraventricular nodule	Resection
TP15	Glioblastoma (MGNT)	5	F	Brainstem	Biopsy
TP82	Glioblastoma ¹ (MGNT)	8	M	Thalamus	Resection
TP26	Unclassifiable (MGNT)	1.2	M	Temporal lobe	Resection

The WHO [1] and, when applicable, the Sainte-Anne Hospital classification [35] in parenthesis are indicated.

¹Recurrence.

doi:10.1371/journal.pone.0016375.t001

the cultures containing cells with extended self-renewal capacities (6/19), all derived from grade II-IV gliomas (one astrocytoma II, two astrocytoma III, two oligoastrocytoma III and one glioblastoma), could be maintained beyond 6 months of culture. The

others underwent a proliferation arrest, followed by their progressive disappearance.

Tumor cells with prolonged self-renewal properties are associated with poor patient outcome

We evaluated the prognostic factor of patients with self-renewing tumor cells. For the whole cohort (45 patients for which clinical information was available) we found a strong statistical correlation between the dead/alive status of the patient and the self-renewal properties of the tumor cells (P=0.001, chi-square test), tumor cells with limited neural progenitor-like self-renewal properties defining a group of patients with intermediate survival expectancies (Figure 2). At the time of analysis (November 2010), only 55% of the patients with a tumor containing “stem-like tumor cells” were alive, versus 78% and 100% with tumors containing “progenitor-like tumor cells” and no self-renewing cells, respectively. Survival analysis of the whole cohort indicated that tumors containing “stem-like tumor cells” were associated with a poorer

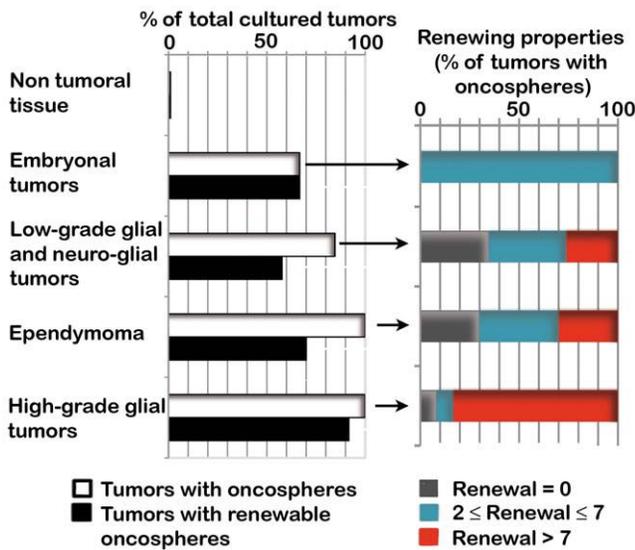


Figure 1. Self-renewal properties of cell-forming oncospheres derived from pediatric brain tumors. Left panel. Percent of tumors yielding cell-forming oncospheres (white bars) and oncospheres able to self-renew at least twice (dark bars). Right panel. The majority of high-grade glioma-derived oncospheres exhibited higher self-renewal properties than oncospheres derived from embryonal tumors, low-grade glial and neuro-glial tumors or ependymomas. Grey bars: cultures containing oncospheres devoid of self-renewal properties. Blue bars: cultures containing oncospheres with limited self-renewal abilities akin to neural progenitor-like cells. Red bars: cultures containing oncospheres with extended self-renewal properties akin to neural stem-like cells.

doi:10.1371/journal.pone.0016375.g001

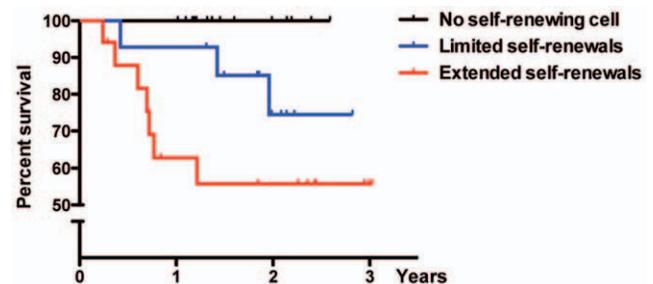


Figure 2. Association of self-renewal capacities with survival. Kaplan-Meier curves of the whole cohort show that patients whose tumor had led to cells having self-renewal properties akin to neural stem cells had a poorer prognosis compared to those with progenitor-like properties or those devoid of renewal abilities (P=0.022, log-rank test). Crosses placed over the curves mark the time of the loss of a patient (death or last appointment follow-up).

doi:10.1371/journal.pone.0016375.g002

outcome ($P=0.013$, log-rank test; Figure 2). Although patients with tumors containing “progenitor-like cells” appeared to constitute an intermediate group of survival, this group did not reach statistical significance as compared with either of the other groups. Multivariate Cox regression analysis in the full cohort showed that isolation of cancer cells with extended self-renewal properties from the tumors of the patients were a significant prognostic marker for survival, independent of age group and histopathological subtype (95% CI, 0.07 to 0.79; $P=0.018$). However, no statistical significance was reached when the analysis was restricted to the high-grade gliomas subgroup.

Neural stem cell and mesenchymal molecular profiles in pediatric brain tumor-derived oncospheres

Pediatric glioma self-renewing cells exhibited a neural profile. In all cultures studied by immunocytochemistry, cell-forming spheres shared markers with human fetal neural stem cells (Figure 3). Immunocytochemistry showed that Sox2 and Bmi1, which are necessary for the normal functioning of both embryonic stem cells and neural stem cells [39,40], were expressed by a majority of cells in the low- and high-grade gliomas cultures studied (10/10 and 6/

6 cultures, respectively, Figure 3A, C, and D). Likewise, the neural stem cell marker Nestin was detected in the majority of the cells in all cultures examined (12/12 cultures, Figure 3A, E, and F). In addition, we observed cells immunoreactive for the stage-specific embryonic antigen 4 (SSEA4) a marker of embryonic stem cells and of the early neuro-epithelium [38] in seven of the ten cultures we assayed and that were derived from low- and high-grade glial tumors (Figure 3A–B). In accordance with the well-known co-existence of stem cells with their progeny at different stages of differentiation in neural stem cell as well as TSC cultures growing under the form of floating spheres [6,41], we observed cells immunoreactive for the neural progenitor markers BLBP/FABP7 and Olig2 in oncospheres of the glial tumors examined (12/12 and 5/5 cultures, respectively, Figure 3A, G, H). Immunocytochemistry additionally showed a widespread and robust expression of Vimentin (Figure 3A and Figure S6a), an intermediate filament that, like Nestin, is expressed by neural stem cells and neural progenitors in the developing CNS. Of the markers of neuronal lineage, only β 3-tubulin, which is normally restricted to neuroblasts and immature neurons in the normal CNS and is known to be expressed by tumoral glial cells in adults [47], was observed in

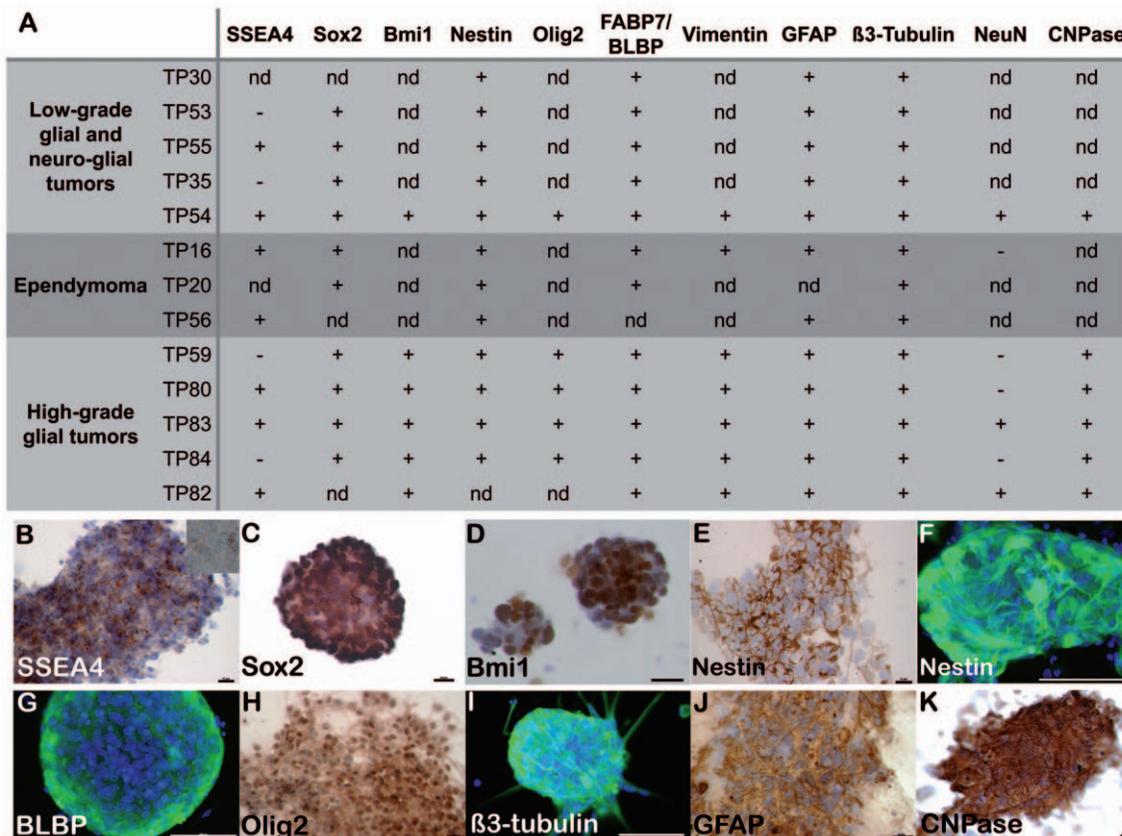


Figure 3. Self-renewing cell-forming spheres derived from both low-grade and high-grade gliomas have a neural stem cell profile combined with neural progenitor markers indicative of both pro-neuronal and pro-glial potencies. **A.** Summary of the immunocytochemical analysis of glioma-derived cells forming self-renewing oncospheres. nd: not determined. +: immunoreactive cells. -: no immunoreactive cells. See text for further details. **B–K.** Examples of immunoreactive cells. **B.** SSEA4-immunoreactive cells in floating spheres derived from an astrocytoma II. **C.** Sox2-immunoreactive cells derived from an oligoastrocytoma III. **D.** Bmi1-immunoreactive cells derived from an astrocytoma III. **E.** Nestin-immunoreactive cells derived from an astrocytoma II. **F.** Nestin-immunoreactive cells derived from an ependymoma. **G.** BLBP/FABP7-immunoreactive cells derived from an ependymoma III. **H.** Olig2-immunoreactive cells derived from an astrocytoma III. **I.** β 3-tubulin-immunoreactive cell-forming spheres derived from a pilocytic astrocytoma. **J.** GFAP-immunoreactive cells derived from an oligoastrocytoma III. **K.** Example of CNPase-immunoreactive cells in an astrocytoma II culture. Bar = 15 μ m in B and K, 20 μ m in C, H and J; 25 μ m in D, E; 100 μ m in F, G, and I. In panels E, H, J and K, the floating oncospheres were smeared onto a glass slide prior to being submitted to the immunocytochemical procedure. B–K, Hemalun or DAPI counterstaining.

doi:10.1371/journal.pone.0016375.g003

all cultures examined (20 to 50% of positive cells in 13/13 cultures, Figure 3A, and I). Conversely, cells expressing NeuN, a marker of mature neurons, were exceptionally observed (rare cells in 3/7 cultures, Figure 3A and Figure S6b). Cells expressing GFAP, which is normally observed *in vivo* in astrocytes and in neural progenitors and neural stem cells of the developing human brain [48], were abundant (>50% of the cells) in all our cultures (12/12 cultures, Figure 3A, and J). Surprisingly, the enzyme CNPase that is normally produced by myelinating oligodendrocytes, was expressed by the majority of cells in the six cultures examined (Figure 3A, and K).

We completed this study by determining in one low-grade and three high-grade glioma-derived cultures the expression of the neural stem cell markers Prominin/CD133 and SSEA1/CD15 as well as the levels of embryonal/neural stem cells and mesenchymal markers as compared to neural stem cells. FACS revealed that a majority of the cells expressed Prominin/CD133, SSEA1/CD15, or both proteins in the four cultures (Figure 4A). Comparative profiling of tumor-derived oncospheres and neural stem cells with regards to markers of embryonic stem cells, neural stem cells, neural progenitors, and mesenchymal cells was achieved using qPCR. A mesenchymal signature has recently been shown to be associated with the expression of several markers of neural stem

cells in adult glioblastomas TSCs [49]. Transcripts of the embryonic stem cell markers Oct4, Nanog, and - at low levels - Klf4 were detected in the four tumor cultures examined (one astrocytoma II, two astrocytoma III and one oligoastrocytoma III that yielded cell-forming spheres with extended self-renewal properties, Figure 4B). Surprisingly, three of them exhibited enhanced Oct4 and Nanog transcript levels as compared to both control tissues and fetal neural stem cells (Figure 4B). Enhanced levels of transcripts encoding Sox2, Musashi 1, Nestin and Vimentin were observed in the glioma cultures assayed and in neural stem cells as compared to adult cortical tissues (Figure 4B). We also observed expression of transcripts encoding the neural progenitor marker BLBP/FABP7 in neural stem cells and in glioma-derived cell spheres (Figure 4B). Enhanced levels of Achaete-scute complex Homolog 1 (ASCL1) and Doublecortin (DCX) transcripts, markers of neural progenitors engaged in the early steps of neuronal differentiation [42,43], were observed in human fetal neural stem cells and all glioma cell cultures examined as compared to adult cortical tissues (Figure 4B). In contrast, increased transcript levels of hyaluronan/CD44, which is normally expressed by astrocyte progenitors [44] and frequently overexpressed in TSCs derived from solid tumors (including gliomas) [45], were observed in all the tumor cultures assayed but not in the

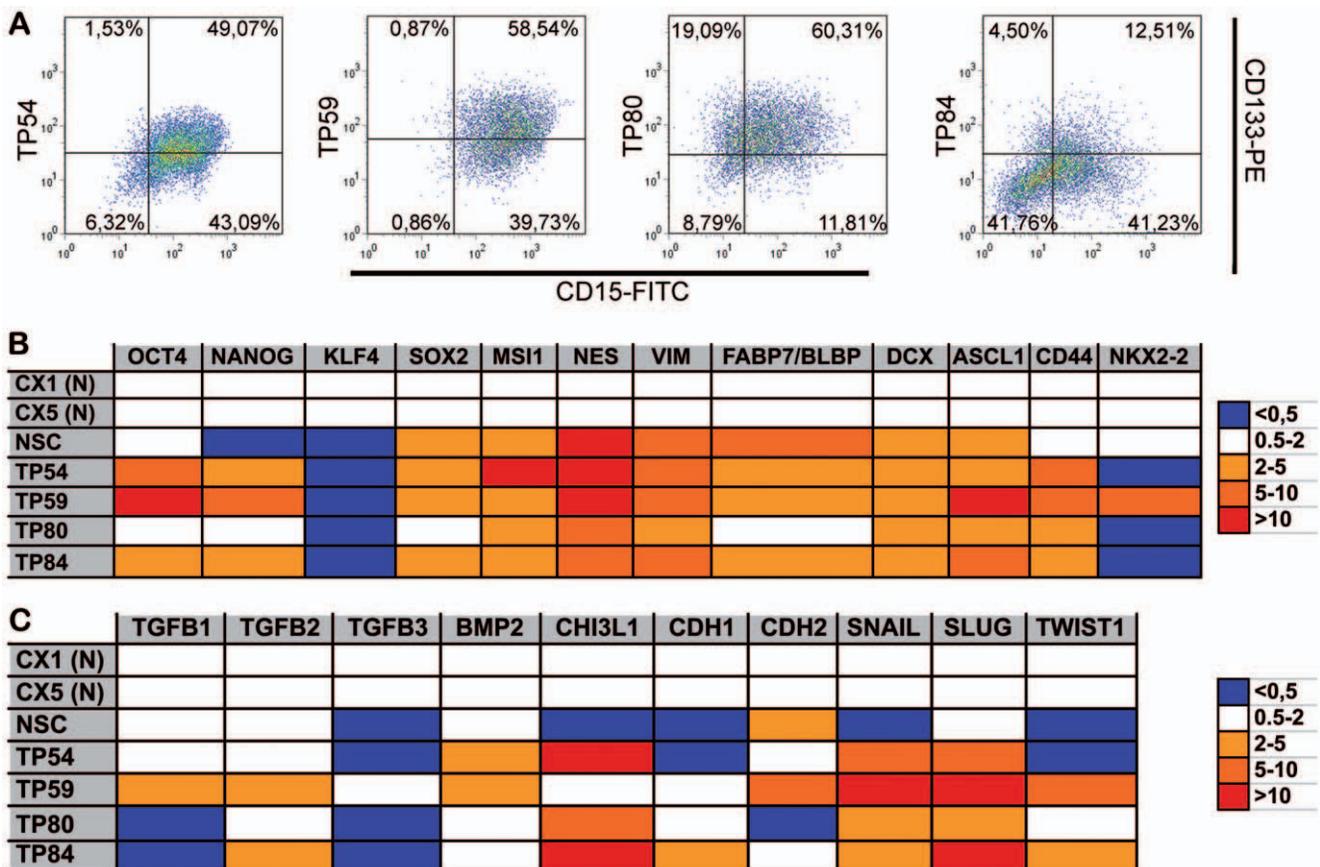


Figure 4. Neural stem cell and mesenchymal molecular profiles of pediatric brain tumor-derived oncospheres. **A.** Fluorocytometric analysis of the expression of the neural stem cell markers CD15 and CD133 by cells derived from low- (TP54) and high-grade gliomas (TP59, 80, and 84). **B.** Comparative qPCR analysis of cell lineage marker expression in different pediatric glioma-derived cells (TP) and human fetal neural stem cells (NSC). Results are presented relative to the mean transcript levels measured in controls (adult human biopsies of cortices from epileptic patients, CX1, CX5). Astrocytoma II-derived oncospheres (TP54), astrocytoma III-derived oncospheres (TP59, TP80), oligoastrocytoma III-derived oncospheres (TP84). Musashi 1 (MSI1), Nestin (NES), Vimentin (VIM), brain lipid binding protein (FABP7/BLBP), Doublecortin (DCX). **C.** Altered transcript levels of several genes normally expressed in mesenchymal cells distinguish pediatric glioma-derived cultures (TP) from neural stem cells (NSC). doi:10.1371/journal.pone.0016375.g004

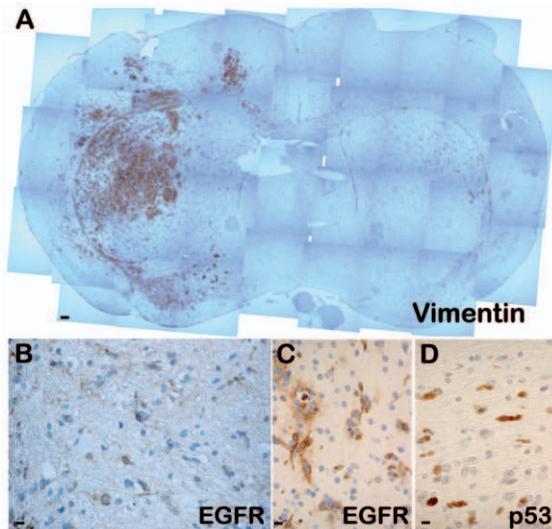


Figure 5. Tumor formation by cells with stem-like properties derived from pediatric gliomas. **A.** Example of tumor formation by cells derived from an astrocytoma II culture 6 months after grafting into the right striatum of nude mice. The grafted cells were identified using an antibody specific to the human form of Vimentin. As in the original patient tumor (**B**), the cells that composed the mouse tumors expressed EGFR (**C**) and exhibited p53-immunolabeling (**D**). Hemalum counterstaining. Bars = 110 μ m in A, 10 μ m in B, C and D. doi:10.1371/journal.pone.0016375.g005

human fetal neural stem cells, as compared to adult cortical tissues (Figure 4B). Conversely, NKX2.2 expression, which is normally present in neural progenitors engaged in the early steps of oligodendroglial differentiation [46], was down-regulated except in TP59, one of the two astrocytoma III cultures included in this assay (Figure 4B). We finally observed enhanced transcript levels of several genes known to play crucial roles in the adoption of a mesenchymal phenotype [50] in all the cultures we tested, as compared to both control tissues and fetal neural stem cells (Figure 4C).

Taken together, these results show that despite an extensive diversity of molecular markers, cell-forming spheres derived from both low-grade and high-grade gliomas have a common neural stem cell profile combined with neural progenitor markers indicative of both pro-neuronal and pro-glial potencies. This molecular profile comprises elements known to control mesenchymal transitions in the low- and high-grade glioma cultures we sampled.

In vivo formation of highly infiltrative tumors by pediatric glioma-derived oncospheres

To determine their tumor-initiating properties, cell-forming spheres with self-renewing ability derived from three cultures (TP54, TP80, TP82) were grafted into the brains of nude or NSG mice, which were sacrificed 3.5 to 6 months post-graft. In the three mice grafted with TP54-derived cells, tumor cells were observed throughout both hemispheres (Figure 5A). As in the original patient tumor (an infiltrating brainstem glioma), numerous cells were disseminated, were EGFR-immunoreactive (compare Figure 5B with 5C), and had abnormal nuclei with p53-immunoreactivity (Figure 5D and E). Similarly, grafts of TP80- and TP82-derived cells resulted in tumor formation (Figure 6). Among the cultures containing oncospheres that did not self-renew, one (TP77) yielded a numbers of spheres sufficient to allow

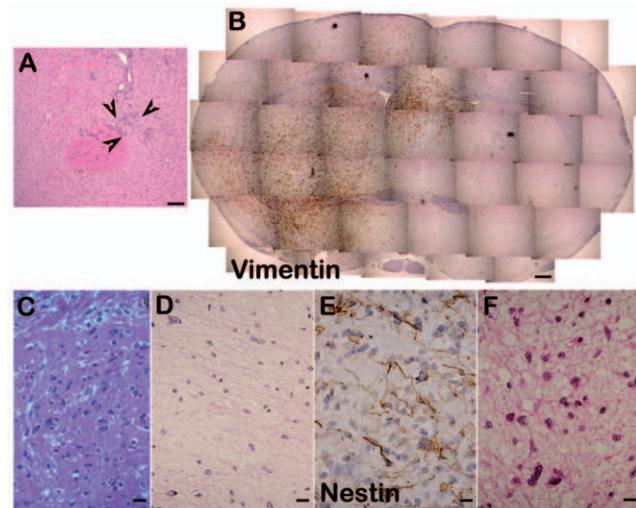


Figure 6. Tumor initiating properties of glioma-derived oncospheres with and without self-renewal abilities. **A.** Grafting of cell forming spheres derived from a ganglioglioma (TP77), which lacked self-renewal ability resulted in small accumulation of cells (arrows) but not in tumor formation. **B–D.** *In vivo* tumor formation by tumor cells with stem-like properties derived from pediatric gliomas. **B.** Two out of five mice grafted with cells derived from an astrocytoma III (TP80) exhibited a robust development of tumor cells, which reproduced the appearance of the patient original tumor, as observed using Vimentin-immunolabeling. **C–D.** The histological aspect of the mouse tumor (**C**) was comparable to that of the patient original tumor (**D**). **E–F.** A large, infiltrating tumor was observed 6 months after grafting into the right striatum in one of the three NSG mice grafted with glioblastoma-derived cells (TP82). Immunolabeling with an antibody that recognized the human but not the rodent form of Nestin (**E**) revealed cells endowed with an elongated, bipolar morphology similar to that observed in the patient tumor (**F**). C and F, hemalum/phloxin counterstaining. A, B, D, E, hemalum counterstaining. Bar = 100 μ m in A, 250 μ m in B, 20 μ m in C and D, 10 μ m in E and F. doi:10.1371/journal.pone.0016375.g006

determining their tumor-initiating properties *in vivo*. Grafting of TP77-derived oncospheres in the brain of immunodeficient mice resulted only in a modest cell accumulation at the injection site (Figure 6A), showing that these cells devoid of self-renewal properties *in vitro* lacked also tumor-initiating properties *in vivo*.

Together, these results indicate that the tumor cells with long-term self-renewing capacities we engrafted in mouse brains resulted in the *in vivo* development of tumors that recapitulated the histological and molecular profile of the original human tumor.

Pediatric glioma-derived oncospheres are resistant to genotoxic stress

According to the TSC hypothesis, tumor recurrence results from TSC resistance to current therapeutics. The radio- and chemosensitivity of cell-forming spheres derived from pediatric gliomas was evaluated using irradiation and the DNA-alkylating agent temozolomide on four glioma cultures of TSC with long-term self renewing capacities (two astrocytomas III, TP59 and TP80, and two oligoastrocytomas III, TP83 and TP84) and on human fetal brain-derived neural stem cells used for comparison. Metabolic activity, taken as a survival index, was evaluated one week post-irradiation or after exposure to a high concentration of temozolomide. As depicted in Figure 7, TSC derived from pediatric gliomas survived significantly better than neural stem cells after both treatments (Student-Newman-Keuls test, $p < 0.001$).

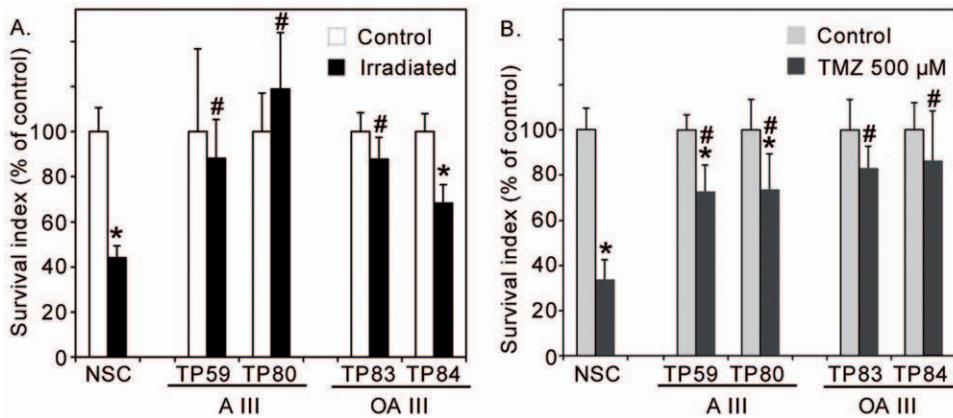


Figure 7. Resistance of pediatric high-grade glioma-derived tumor stem-like cells to irradiation (A) and temozolomide (B) compared to human fetal neural stem cells (NSC). A: astrocytoma. OA: oligoastrocytoma. Data represent the mean \pm s.d. (n=3). Student-Newman-Keuls test, *: $p < 0.001$ as compared to the respective controls. #: $p < 0.001$ as compared to irradiated NSC in (A) or temozolomide-treated NSC in (B). doi:10.1371/journal.pone.0016375.g007

Discussion

This study provides evidence that tumor cells expressing markers and self-renewal properties of neural progenitors or neural stem cells can be isolated, and cultured from most pediatric brain tumors regardless of subtype or grade of malignancy. Further analysis of one low-grade and three high-grade glioma cultures showed that the cells we isolated expressed a complex molecular profile that combined mesenchymal and neural elements, suggesting a high potential of plasticity. Testing *in vivo* tumorigenicity, we verified that non self-renewing cells did not form tumors when engrafted in immunodeficient mice brains whereas the three long-term self-renewing ones we tested generated tumors respecting the histological and molecular profile of the original human lesion. Of note, as their adult counterparts [4,5], the four children gliomas-derived TSC tested here resisted to chemo- or radiotherapy.

Although cell-forming self-renewing spheres isolated in this study did not share a unique molecular signature, they all presented a molecular profile highly similar to that expected for neural progenitors and/or neural stem cells [40]. This immature neural profile was associated in the four TSCs cultures we tested with high-transcript levels of molecules normally present in mesenchymal cells including CHI3L1/YKL40, which is also known as a marker of adult glioblastoma aggressiveness [51]. This observation echoes those recently reported in adult glioma tissues [52] and in adult glioblastoma-derived TSCs [49,53], and lends credence to the view that brain TSCs could be characterized by the unique association of a neural stem cell profile and of a mesenchymal profile essential for maintaining the tumor initiating properties of the cells [49]. Epithelial to mesenchymal transition is a well-known event, which presides on epithelial cancer metastasis [50], and the most aggressive forms of adult gliomas cluster with a mesenchymal signature [52]. Most importantly, sharing of a common molecular profile by cells obtained from pediatric and adult tissues, and from different gliomas subtypes with different genomic alterations reinforces the idea that glioma cancer cells with stem properties play crucial roles in glioma development.

Our observation that tumor cells with self-renewal properties and markers of neural progenitors and neural stem cells can be isolated from a majority of pediatric brain tumors favors our initial hypothesis that TSCs are a common component of brain tumors. Our success in derivation of self-renewing oncospheres from

pediatric high-grade brain tumors is comparable with or above the 50% average success rate reported to date on adult high-grade gliomas using the neurosphere assay [7,9,11,13,54,55]. During the redaction of the present work, a study of 56 pediatric tumors described the obtaining of oncospheres passable three times from 50% high-grade glial tumors (high-grade gliomas and anaplastic ependymomas), and 20% pilocytic astrocytomas [56], compared to 85% and 61% observed here for pediatric tumors of the same histological sub-types. Lack of self-renewing oncospheres in a minority of the surgical samples cultures may result from either absence of such cell types in the tumors or from their requirement of specific growth conditions. The higher yield of self-renewing oncospheres we observed within a given tumor category, when compared to Panoysan and colleagues [56], was especially marked for low-grade neoplasms. This observation suggests that the ability to derive cells with properties akin to neural progenitors or neural stem cells from a given tumor could be more dependent on the absolute numbers of cells endowed with progenitor or stem properties within the cultured tumor sample, than on the optimization of culture conditions for each histological tumor sub-type. Further experiments are necessary to address this issue.

Our analysis over the whole tumor cohort showed a correlated segregation into three distinct sub-groups between survival expectancy and the type of self-renewing properties of the cancer cells, independent of age group and histopathological type of the tumor. The predictability of this correlation for individual patients must be moderated according to the finding of tumor cells with limited or extended self-renewing properties in low-grade tumors from patients that remained clinically stable without any post-surgical treatment, and the fact that we obtained such cells from a large majority of tumors within all categories examined. However, distinction of an intermediate survival group formed by tumor cells with limited self-renewal properties indicates that the degree of immaturity of these cells may provide a pertinent novel model for the stratification of pediatric brain tumor prognosis. The most intriguing result of our study is the finding of tumor cells with properties akin to neural progenitors or neural stem cells in most of the tumors examined. Although the frequency of TSCs derivation was higher in high-grade pediatric tumor, our data indicate that in children such cells were not the monopoly of the most malignant form of glial tumors contrary to what can be inferred from the studies on adult brain tumors [6–11,13]. This could suggest that cells with stem cell-like or progenitor-like properties are more

frequent components of pediatric brain tumors than of adult brain tumors. Consequently, TSCs could be an essential driving force of pediatric brain tumors and a dispensable element of adult ones. Alternatively, the fact that such cells were not systematically found in all tumors within a given category, opens the possibility that they are not present at all time-points of the tumor development. The exceptional plasticity of normal somatic cells, exemplified by the ability of glial progenitors [57], and the ability of mature glial cells [58,59] to be converted into stem-like cells in response to defined environmental conditions could suggest that brain cancer cells can acquire properties of progenitor cells or of stem cells in response to permissive environmental pressure. Such a possibility would imply that therapeutic anti-cancer strategies should take cell plasticity into account.

Supporting Information

Figure S1 Isolation and characterization of neural stem cells from human fetal brain. All studies with human tissue were performed under Ethical Approval from the University Paris-Descartes internal review board using tissue donated with informed consent after elective termination of pregnancy. Human fetal brain at embryonic day 50-55 (Carnegie stage 19-22) were carefully dissected and mechanically dissociated into single cell suspensions. Primary cells were cultured under the form of floating spheres in NeuroCult® NSC Basal Medium supplemented with NeuroCult® Proliferation Supplements (StemCell Technologies), human EGF 20 ng/mL, human b-FGF 10 ng/mL (AbCys) and Heparin 20 ng/mL (Sigma-Aldrich) final. Two primary cultures of neural stem cells (NSC24 and NSC25) were established from two distinct fetuses, and expanded with a passage every two weeks. No culture crisis, spontaneous differentiation or abnormal genetic derivation as assessed by CGH array was detected over one year of continuous culture. Clonal properties were determined after 4 months of culture (passage 12) by manual deposition of 1 cell/100 μ L into non-coated 96-well plates. Fifty μ L of medium was added every two weeks during two months. $5.9\% \pm 1.2$ of CSN24 cells, and $4.5\% \pm 1.6$ of CSN25 cells yielded spheres in these conditions. Immunocytochemical analysis showed that most cells expressed the NSC markers Sox2, Bmi1 and Nestin, while no cell immunoreactive for Synaptophysin, phosphorylated neurofilaments, and NeuN was observed. **Left panel:** Immunocytochemical labeling showing protein expression of the NSC markers Bmi1, Sox2 (brown nuclei staining) and Nestin (brown cytoplasm staining). Hemalun counterstaining. Scale bar = 25 μ m. **Right panel:** Entire genome profile of NSC using HumanCytoSNP-12 Beadchip. These graphs represent the allelic copy ratio in terms of B allele frequency (diagnosing genetic aberrations) and the log₂ ratio of the fluorescence intensities along each chromosome noted log R ratio (monitoring physical aberrations). Copy number was normal (CN = 2), no duplication or deletion were detected. (TIF)

Figure S2 Distinct behavior in serum-free medium cultures of cells derived from low-grade gliomas and neuro-glial tumors as compared with other pediatric brain tumors-derived cells. a. As expected, cells growing under the form of floating oncospheres were observed in cultures of medulloblastoma (MDB). **b–n.** Oncospheres were observed in cultures derived from both low- and high-grade brain tumors. Cultures of pilocytic astrocytomas and gangliogliomas were characterized with anchored clusters of round shaped cells from which cells with long extensions departed. Floating cellular spheres budded from the attached cell networks. Over time, cells could

spread between the clusters, forming loosely dense networks. Only the floating spheres could be expanded. All attempts to amplify the cell networks through re-seeding were unsuccessful. **b–c.** Cultures of pilocytic astrocytomas formed cell networks anchored to the culture vials (**b**) prior to develop under the form of oncospheres (**c**) that coexisted with anchored cells. **d–e.** Ganglioglioma derived cells formed anchored cell networks developing from cellular aggregates (**d**) prior to yield oncospheres (**e**). Among the low-grade gliomas cultured, only the grade II astrocytoma-derived cells developed straightforwardly under the form of floating spheres. **f–g.** All ependymoma cultures contained floating spheres. Ependymoma-derived cells exhibited various growth aspects from one sample to another. They grew either under the form of anchored cells prior to yield oncospheres (**f**) or directly under the form of free-floating oncospheres (**g**). **h–n.** Floating spheres were observed in all high-grade gliomas cultures within two weeks post-seeding, and dominated over anchored cells. **h–j.** Cells derived from astrocytomas grew under the form of oncospheres (**h** and **j**) coexisting with cells and cellular aggregates loosely anchored to the culture vial (**i**). **k.** Oligoastrocytoma-derived cells developed as oncospheres. **l–m.** Glioblastoma-derived cells developed under the form of patches of anchored-cells, which yielded oncospheres. **n.** Example of oncospheres derived from a tumor corresponding to a MGNT according to Sainte-Anne hospital classification. (TIF)

Figure S3 Self-renewal properties of oncospheres derived from each tumor category. The absolute numbers of tumors are indicated on each bar. Grey bars: tumor-derived cultures containing oncospheres devoid of self-renewal properties. Blue bars: tumor-derived cultures containing oncospheres with limited self-renewal (SR) ability akin to neural progenitor-like cells ($2 \leq SR \leq 7$). Red bars: tumor-derived cultures containing oncospheres with extended self-renewal property akin to neural stem-like cells ($SR > 7$). In **a**, the tumors are categorized along the WHO classification and in **b** along the Sainte-Anne hospital classification. (TIF)

Figure S4 Clonal properties of cell-forming spheres (a). **b–c.** Example of colony obtained in methylcellulose medium for a ganglioglioma culture (**b**) and an astrocytoma culture (**c**). (TIF)

Figure S5 Examples of cytogenomic profiles of oncospheres derived from a paediatric astrocytoma II (a) and III (b). Aberrations were obtained with the ADM2 algorithm and filtering options of a minimum of 3 probes and abs (\log_2 ratio) = 0.4. Profiles of segmental chromosomal copy number alterations (\log_2 ratio > 0.4) are represented with green (losses) and red (gains) lines. (TIF)

Figure S6 Examples of vimentin, and neuN expression in oncospheres derived from an oligoastrocytoma III (a) and a fibrillary astrocytoma II (b). Bar = 20 μ m in a, 10 μ m in b. (TIF)

Table S1 Antibodies used for immunocyto- (ICC), immunohistochemical (IHC), and flow cytometry (FACS) analyses. All incubations for ICC and IHC were performed for 1 hour at room temperature unless otherwise indicated. Cells growing under the form of cellular spheres were collected, mechanically spread onto Superfrost glass slides (Dutscher,

France), and fixed for 10–30 min in ethanol at room temperature. Cells growing in an anchored manner were directly treated with 2–4% paraformaldehyde in PBS for 10 min. Eight μm -thick sections were prepared from paraffin-embedded mouse brains, and from initial tumor samples, and 30 μm -thick free-floating sections from frozen mice brains. For FACS, cells were labelled with anti CD133-PE and anti CD15-FITC antibodies in a ratio of 5 μL of each antibody per 10^6 cells in a total volume of 100 μL for 30 minutes at 4°C. Isotype controls coupled to the same fluorophores were used as control antibodies. Data acquisition was performed on FACScalibur (BD Biosciences) and analysed using FlowJo software (Tree Star Inc.).

(DOC)

Table S2 Immunohistochemical detection of p53 in a subset of the original patient tumor panel.

(DOC)

References

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97–109.
- Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, et al. (2008) Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* 113: 1953–1968.
- Park DM, Rich JN (2009) Biology of glioma cancer stem cells. *Mol Cells* 28: 7–12.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, et al. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756–760.
- Nakai E, Park K, Yawata T, Chihara T, Kumazawa A, et al. (2009) Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from Glioblastoma. *Cancer Invest* 27: 901–908.
- Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, et al. (2002) Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39: 193–206.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, et al. (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, et al. (2004) Henkelman, M.D. Cusimano, P.B. Dirks, Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396–401.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, et al. (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human Glioblastoma. *Cancer Res* 64: 7011–7021.
- Varlet P, Soni D, Miquel C, Roux FX, Meder JF, et al. (2004) New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases. *Neurosurgery* 55: 1377–1391; discussion 1391–1372.
- Patru C, Romao L, Varlet P, Coulombel L, Raponi E, et al. (2010) CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glioneuronal tumors. *BMC Cancer* 10: 66.
- Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, et al. (2003) Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15178–15183.
- Laks DR, Masterman-Smith M, Visnyci K, Angenieux B, Orozco NM, et al. (2009) Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma. *Stem Cells* 27: 980–987.
- Louis SA, Rietze RL, Deleyrolle L, Wagey RE, Thomas TE, et al. (2008) Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem Cells* 26: 988–996.
- Vescovi AL, Gritti A, Galli R, Parati EA (1999) Isolation and intracerebral grafting of nontransformed multipotential embryonic human CNS stem cells. *J Neurotrauma* 16: 689–693.
- Grimmer MR, Weiss WA (2006) Childhood tumors of the nervous system as disorders of normal development. *Curr Opin Pediatr* 18: 634–638.
- Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, et al. (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23: 9392–9400.
- Dufour C, Cadusseau J, Varlet P, Surena AL, de Faria GP, et al. (2009) Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation. *Stem Cells* 27: 2373–2382.
- Dai C, Holland EC (2003) Astrocyte differentiation states and glioma formation. *Cancer J* 9: 72–81.
- Sutter R, Yadirgi G, Marino S (2007) Neural stem cells, tumour stem cells and brain tumours: dangerous relationships? *Biochim Biophys Acta* 1776: 125–137.
- Kalifa C, Grill J (2005) The therapy of infantile malignant brain tumors: current status? *J Neurooncol* 75: 279–285.
- Nakamura M, Shimada K, Ishida E, Higuchi T, Nakase H, et al. (2007) Molecular pathogenesis of pediatric astrocytic tumors. *Neuro Oncol* 9: 113–123.
- Bredel M, Pollack IF, Hamilton RL, James CD (1999) Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood. *Clin Cancer Res* 5: 1786–1792.
- Bax DA, Little SE, Gaspar N, Perryman L, Marshall L, et al. (2009) Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development. *PLoS One* 4: e5209.
- Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, Su X, Liu Y, et al. (2005) Radial glia cells are candidate stem cells of Ependymoma. *Cancer Cell* 8: 323–335.
- Platet N, Liu SY, Atifi ME, Oliver L, Vallette FM, et al. (2007) Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett* 258: 286–290.
- Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, et al. (2007) CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 67: 4010–4015.
- Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Boe SO, et al. (2008) CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 122: 761–768.
- Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A (2007) Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science* 317: 337.
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, et al. (2008) Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456: 593–598.
- Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, et al. (2010) A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 17: 362–375.
- Gritti A, Galli R, Vescovi AL (2001) Cultures of stem cells of the central nervous system. In: Fedoroff S, Richardson A, editors. *Protocols for neural cell culture*. Humana Press. pp173–198.
- Sharif A, Renault F, Beuvon F, Castellanos R, Canton B, et al. (2004) The expression of PEA-15 (phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa) defines subpopulations of astrocytes and neurons throughout the adult mouse brain. *Neuroscience* 126: 263–275.
- Bieche I, Parfait B, Laurendeau I, Girault I, Vidaud M, et al. (2001) Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* 20: 8109–8115.
- Varlet P, Jouve A, Miquel C, Saint-Pierre G, Beuvon F, et al. (2005) Criteria of diagnosis and grading of oligodendrogliomas or oligo-astrocytomas according to the WHO and Sainte-Anne classifications. *Neurochirurgie* 51: 239–246.
- Kelley TW, Tubbs RR, Prayson RA (2005) Molecular diagnostic techniques for the clinical evaluation of gliomas. *Diagn Mol Pathol* 14: 1–8.
- Sung T, Miller DC, Hayes RL, Alonso M, Yee H, et al. (2000) Preferential inactivation of the p53 tumor suppressor pathway and lack of EGFR amplification distinguish de novo high grade pediatric astrocytomas from de novo adult astrocytomas. *Brain Pathol* 10: 249–259.
- Barraud P, Stott S, Mollgard K, Parmar M, Bjorklund A (2007) In vitro characterization of a human neural progenitor cell coexpressing SSEA4 and CD133. *J Neurosci Res* 85: 250–259.
- Park IK, Morrison SJ, Clarke MF (2004) Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest* 113: 175–179.
- Nicolis SK (2007) Cancer stem cells and "stemness" genes in neuro-oncology. *Neurobiol Dis* 25: 217–229.
- Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA (2006) Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 6: 425–436.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. DiRocco, Dr. Roujeau, and Dr. Zerah for their help in sample collection, to S. Dubleumortier for excellent technical expertise, J. Lacombe for constant support, M. figeac for his help in the CGH analysis, Dr. Coffigny and Prof. Frydman for providing fetal brain tissues, and the Curie Institute for access to irradiation facilities.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CT BB PV SP IB JG HC MPJ. Performed the experiments: CT BB JC SDRT JMS DCS AS AB ALS ADM NL MPJ. Analyzed the data: CT BB PV SP JC SDRT JMS DCS CV CM FDB IB CDD HC MPJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: FP CSR JG CDD. Wrote the paper: HC MPJ.

42. Kageyama R, Ishibashi M, Takebayashi K, Tomita K (1997) bHLH transcription factors and mammalian neuronal differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1389–1399.
43. Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, et al. (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467: 1–10.
44. Liu Y, Han SS, Wu Y, Tuohy TM, Xue H, et al. (2004) CD44 expression identifies astrocyte-restricted precursor cells. *Dev Biol* 276: 31–46.
45. Xu Y, Stamenkovic I, Yu Q (2010) CD44 attenuates activation of the hippo signaling pathway and is a prime therapeutic target for Glioblastoma. *Cancer Res* 70: 2455–2464.
46. Hu BY, Du ZW, Zhang SC (2009) Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 4: 1614–1622.
47. Katsetos CD, Draberova E, Legido A, Draber P (2009) Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. II. gamma-Tubulin. *J Cell Physiol* 221: 514–520.
48. Middeldorp J, Boer K, Sluijs JA, De Filippis L, Encha-Razavi F, et al. (2010) GFAPdelta in radial glia and subventricular zone progenitors in the developing human cortex. *Development* 137: 313–321.
49. Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, et al. (2010) The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* 463: 318–325.
50. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871–890.
51. Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D, Ozawa T, Tandon A, et al. (2009) Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations, *PLoS One* 4: e7752.
52. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, et al. (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9: 157–173.
53. Liu Q, Nguyen DH, Dong Q, Shitaku P, Chung K, et al. (2009) Molecular properties of CD133+ glioblastoma stem cells derived from treatment-refractory recurrent brain tumors. *J Neurooncol* 94: 1–19.
54. Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, et al. (2008) Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* 27: 2897–2909.
55. Pallini R, Ricci-Vitiani L, Banna GL, Signore M, Lombardi D, et al. (2008) Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 14: 8205–8212.
56. Panosyan EH, Laks DR, Masterman-Smith M, Mottahedeh J, Yong WH, et al. (2010) Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passageable neurosphere formation. *Pediatr Blood Cancer* 55: 644–651.
57. Kondo T, Raff M (2000) Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289: 1754–1757.
58. Real C, Glavicux-Pardanaud C, Le Douarin NM, Dupin E (2006) Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potential. *Dev Biol* 300: 656–669.
59. Sharif A, Legendre P, Prevot V, Allet C, Romao L (2007) Transforming growth factor alpha promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells. *Oncogene* 26: 2695–2706.

C. Conclusion

Quel que soit le type et le grade tumoral, l'équipe a pu démontrer pour la première fois de façon détaillée l'existence de cellules qui expriment des marqueurs spécifiques aux progéniteurs neuraux ou aux NSC et possèdent des propriétés souches telles que la croissance indépendante de l'ancrage en neurosphères et l'auto-renouvellement. De plus, les GSC dérivées des tumeurs pédiatriques sont tumorigènes et produisent une phénocopie de la tumeur d'origine après xenotransplantation intracérébrale. Contrairement aux gliomes de l'adulte où les GSC sont avant tout isolées de tumeurs de haut grade, nous avons isolé des GSC à partir de gliomes pédiatriques de tout grade, y compris le bas-grade. La fréquence d'obtention des GSC était néanmoins beaucoup plus faible à partir des gliomes pédiatriques de bas grade qu'à partir de gliomes pédiatriques de haut grade.

Les GSC isolées présentent les mêmes propriétés que celles isolées des gliomes de l'adulte, en dépit de différences marquées en termes d'altération génomique et de profil transcriptomique. Elles partagent notamment une résistance aux thérapies actuelles (irradiation, alkylants de l'ADN). La corrélation inverse observée entre leur présence et la survie des patients renforce l'hypothèse selon laquelle les GSC jouent un rôle central dans l'agressivité de la tumeur et constituent donc des cibles thérapeutiques de choix.

Partie 2 : Effets du resvératrol sur les GSC et les NSC

A. Introduction à l'étude menée

Depuis la mise en évidence de cellules souches cancéreuses (GSC), résistantes aux radio- et chimiothérapies et capables d'initier une phénocopie de la tumeur d'origine lors de xénogreffes, il apparaît évident que ces cellules peuvent être définies comme une cible importante à prendre en compte dans le développement de thérapies innovantes pour traiter le glioblastome. Le défi de la recherche actuelle est non seulement d'améliorer la caractérisation des GSC, mais aussi celle des mécanismes moléculaires intrinsèques et environnementaux gouvernant leur prolifération, leur survie, leur localisation et leur phénotype, afin d'élaborer des stratégies thérapeutiques. Dans cette optique, j'ai contribué à l'étude des effets du resvératrol, un polyphénol naturel, sur les GSG.

Le resvératrol est présent dans certains fruits comme les raisins, les mûres ou les cacahuètes. Dans des conditions physiologiques, le resvératrol exerce des effets protecteurs sur les neurones mais ses effets sur les cellules souches neurales n'ont pas été déterminés (*Sun et al., 2010*). Dans un contexte tumoral, le resvératrol exerce au contraire une action inhibitrice sur différents comportements des cellules cancéreuses, notamment la prolifération et la survie (*Zhang et al., 2010 ; Jiang et al., 2005*). Plusieurs études précliniques ont ainsi été menées avec le resvératrol notamment dans le cancer colorectal et les métastases hépatiques (*Howells et al., 2011*). Les effets anti-tumoraux du resvératrol ont également été montrés dans les lignées cellulaires classiques de glioblastomes, mais ses effets n'ont pas été étudiés dans les GSC ni dans les NSC humaines.

L'objectif de ce travail a donc été de déterminer les effets du resvératrol sur les NSC et les GSC, en tentant d'identifier les mécanismes qui sous-tendent ses effets.

B. Article n°2

Sirtuin-2 Activity is Required for Glioma Stem Cell Proliferation Arrest but not Necrosis Induced by Resveratrol

Salwa Sayd, Cécile Thirant, Elias A. El-Habr, Joanna Lipecka, Luiz Gustavo Dubois, Alexandra Bogeas, Nadia Tahiri-Jouti, et al.

Stem Cell Reviews and Reports

ISSN 1550-8943

Stem Cell Rev and Rep
DOI 10.1007/s12015-013-9465-0



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Sirtuin-2 Activity is Required for Glioma Stem Cell Proliferation Arrest but not Necrosis Induced by Resveratrol

Salwa Sayd · Cécile Thirant · Elias A. El-Habr · Joanna Lipecka · Luiz Gustavo Dubois · Alexandra Bogeas · Nadia Tahiri-Jouti · Hervé Chneiweiss · Marie-Pierre Junier

© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Glioblastomas, the most common form of primary brain tumors, are the fourth cause of death by cancer in adults. Increasing evidences suggest that glioblastoma resistance to existing radio- and chemotherapies rely on glioblastoma stem cells (GSCs). GSCs are endowed with a unique combination of stem-like properties alike to normal neural stem cells (NSCs), and of tumor initiating properties. The natural polyphenol resveratrol is known to exert opposite actions on neural cells according to their normal or cancerous status. Here, we used resveratrol to explore the molecular mechanisms differing between GSCs and NSCs. We observed a dual action of resveratrol on GSCs: resveratrol blocked GSC proliferation up to 150 μ M and induced their necrosis at higher doses. On the opposite, resveratrol had no effect on NSC behavior. To determine the mechanisms underlying resveratrol effects, we focused our attention on the family of NAD-dependent deacetylases sirtuins (SIRT). A member of this family, SIRT1, has been repetitively shown to constitute a preferential resveratrol target, at least in normal cells. Western blot analysis

showed that SIRT1 and SIRT3 were expressed by both GSCs and NSCs whereas SIRT2 expression was restricted to GSCs. Pharmacological blockade of SIRT2 activity or down-regulation of SIRT2 expression with siRNAs counteracted the inhibitory effect of resveratrol on cell proliferation. On the contrary, inhibition of SIRT2 activity or expression did not counteract GSC necrosis observed in presence of high doses of resveratrol. Our results highlight SIRT2 as a novel target for altering GSC properties.

Keywords Sirtuin · Cancer stem cell · α -tubulin · Necrosis

Introduction

Glioblastomas are the most common and malignant primary tumors of the human adult central nervous system. Despite the combination of surgery, radiotherapy and chemotherapy, the life expectancy of patients diagnosed with glioblastoma is approximately 1 year [1]. A growing body of evidence indicates that a sub-population of tumor cells endowed with stem-like and tumor-initiating properties plays key roles in the development and therapeutic resistance of glioblastomas [2–5]. The properties of these glioblastoma stem cells (GSCs) are sustained at least in part by molecular pathways previously shown to control normal embryonic and/or neural stem cell (NSC) properties, such as the Sonic hedgehog-Gli-Nanog network [6, 7]. Several studies have disclosed an association between tumor formation by GSCs and their peculiar resistance to chemotherapy and radiation treatments, as compared to other cell populations of the tumor [8]. Experiments using lineage tracing to look for the contribution of individual tumor cells to tumor formation, suggest that the replenishment of the tumor by GSCs spared by the treatment is responsible for the failure of current therapies [4]. Deciphering molecular differences between GSCs and NSCs should help to further understand the molecular pathways

Hervé Chneiweiss and Marie-Pierre Junier contributed equally.

S. Sayd · C. Thirant · E. A. El-Habr · J. Lipecka · L. G. Dubois · A. Bogeas · H. Chneiweiss · M.-P. Junier
Team Glial Plasticity, U894 Inserm, Université Paris Descartes, Paris, France

S. Sayd · N. Tahiri-Jouti
Laboratory of Genetics and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Pharmacy of Casablanca, Casablanca, Morocco

H. Chneiweiss (✉) · M.-P. Junier (✉)
U894 Team Glial Plasticity, Center of Psychiatry and Neurosciences,
2ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France
e-mail: herve.chneiweiss@inserm.fr
e-mail: marie-pierre.junier@inserm.fr

Present Address:
C. Thirant
U1009 Inserm IGR Université Paris-XI, Villejuif, France

underlying their properties, and ultimately help in controlling their behavior whilst sparing the normal nervous tissue.

Remarkably, the plant polyphenol resveratrol has been shown to exert opposite effects on normal and cancerous cells [9]. Resveratrol (3,4,5-trihydroxy-trans-stilbene) is a natural polyphenolic phytoalexin widely present in plants and enriched in red wine, peanuts and grapes [10]. This compound has received considerable attention over the last decades, first for its use in treating cardiovascular diseases, and more recently for its neuroprotective effects associated with its ability to cross the blood–brain barrier [11]. Resveratrol beneficial effects are underlined by its antioxidant and anti-inflammatory action and include activation of enzymes such as sirtuins, which regulate longevity genes preventing the deleterious effects triggered by oxidative stress [11]. A major target of resveratrol for its pro-survival function is sirtuin-1 (SIRT1), which bears an allosteric site recognized by resveratrol [12]. SIRT1-mediated p53 deacetylation prevents p53 transcriptional activity and counteracts apoptosis in response to oxidative stress and DNA damage [13]. More recently another member of the sirtuin family, SIRT2, has got much attention due to its involvement in programmed necrosis [14]. SIRT2 is also considered as a mitotic exit regulator and was reported to suppress colony formation in glioma cell lines [15]. Resveratrol effect on SIRT2 activity is however unknown. Of note, resveratrol effects on glioma cell lines depend on the cell line studied and on the compound concentration used, and range from limitation of the proliferation [16–18], and the survival of the cells [19, 20], or enhancement of their sensitivity to the DNA alkylating agent temozolomide [21, 22]. Here, we evaluated resveratrol effects on GSC cultures derived from three distinct glioblastoma biopsies and one grade III oligoastrocytoma as compared to two cultures of human NSCs derived from fetal brains, focusing on members of the sirtuin family as possible mediators of resveratrol action on GSCs.

Materials and Methods

Cell Culture

GSCs were derived from neurosurgical biopsies of human glioblastoma (TG1, TG1N, TG10 and TG16) or of grade III oligoastrocytoma (OB1), and their stem-like and tumor-initiating properties characterized as previously reported [7, 23–27]. NSCs (NSC24 and NSC25) were derived from human fetal brains, and characterized as previously described [5]. GSCs and NSCs were cultured under the form of floating cellular spheres as previously described [5, 25]. Additional cells used in this study corresponded to TG1-miR-302-367. TG1-miR-302-367 cells express in a stable manner the micro-

RNA cluster miR-302-367, previously shown to suppress the stem and tumor properties of GSCs. They were derived from TG1 as previously described [7].

Chemicals and Antibodies

Resveratrol, sirtinol (SIRT1 and SIRT2 inhibitor), EX527 (selective SIRT1 inhibitor), AGK2 (selective SIRT2 inhibitor) and AGK7 (inactive structural isomer of AGK2) were purchased from Sigma (France). N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (zVAD-fmk) was purchased from Calbiochem (San Diego, CA). All compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma), according to manufacturer's instructions. The percentage of DMSO added to the cultures was at most inferior to 0.1 % and was without effect on each cell type used in this study.

Primary antibodies against the following proteins were used: LC3 (1:1000), caspase-3 (1:200) and cleaved caspase-3 (1:200) (Cell Signaling, France), SIRT1 (1:1000), SIRT2 (1:500), SIRT3 (1:500), acetylated α -tubulin (1:10,000) (Santa Cruz Biotechnologies, France), α -tubulin (1:50000, Millipore, France) and GAPDH (1:100,000, Chemicon International, France).

Cell Treatments

Cells were exposed to resveratrol (50, 100, 150, 200, 250 and 300 μ M) for 24 h. Sirtuin inhibitors were used at 0.1 μ M, and added 24 h prior resveratrol treatment. zVAD-fmk was used at 100 μ M and added 30 min prior resveratrol treatment.

Cell Proliferation, Viability and Metabolic Activity

Cell proliferation and viability were evaluated with manual cell counting under phase contrast microscopy following addition of trypan blue (Sigma) at a final concentration of 0.1 % (v/v). Cell proliferation index is equal to: Cell numbers at t_{24h} /Cell numbers at t_{0h} . Cells were seeded in 96-well plates at 2.10^4 cells/well, cultured for 24 h, prior to be treated with the appropriate compounds. Each treatment was assayed in quadruplet. Cell metabolic activity was assessed via measure of NAD(P)H production using reduction of WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate, Roche, France) to water-soluble formazan. At the end of the culture period, 10 % (v:v) WST-1 was added to the culture media, and the cells were further cultured at 37 °C for 3 h. The absorbance was measured at 430 nm in a microplate reader (Expert Plus V1.4 ASYS).

Flow Cytometry Analysis

For cell death analysis, cells were collected, stained with Propidium Iodide (PI, 50 μ g/ml, 10 min at 4 °C, BD Biosciences,

France) then analyzed. For cell cycle analysis, cells were incubated with EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, 10 μ M, Invitrogen) for 24 h, then collected, washed in PBS, fixed with paraformaldehyde (according to manufacturer's protocol) and analyzed after PI staining. Analysis was performed on 10,000-gated events using an ARIA II (BD Biosciences, France). Blue laser (488 nm) and PE-Texas Red filter were used for PI detection, and Red laser (640 nm) and APC filter for EdU detection. Data analysis and figure generation were performed using the FACSDiva version 6.1.2 program (BD Biosciences, France).

Fluorescence Microscopy

Cells were cultured in EdU-containing medium (10 μ M) for 24 h, and then collected, washed in PBS, spread on glass slides, and fixed with methanol. Nuclei were stained with DAPI (200 μ g/ml, Sigma, France). Images were captured with digital still camera (DXM 1200, Nikon, USA) using Lucia software (Laboratory Imaging, Ltd). EdU fluorescence was visualized by excitation at 530–545 nm and emission at 620–660 nm (Texas Red filter). DAPI fluorescence was visualized by excitation at 340–380 nm and emission at 435–485 nm. For analysis all images were viewed and captured at 60 \times magnification using an oil immersion objective. Triplicate fields were randomly selected for each slide.

Immunoblotting

Cells were harvested, washed with PBS, and lysed using lysis buffer (1 % SDS, 25 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 mM sodium orthovanadate, 5 mg/ml leupeptine, 5 mg/ml pepstatin, 5 mg/ml aprotinin, 1 mM PMSF, all from Sigma). Cell lysis was performed on ice for 30 min. Proteins were resolved by 4–12 % SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes for 90 min at 15 V. The membranes were blocked with 5 % non-fat dry milk, then immunoblotted with the appropriate primary antibody overnight at 4 $^{\circ}$ C. The immune complexes were visualized using a chemiluminescent ECL detection kit (PerkinElmer, France).

ATP Measurement

Total ATP levels were monitored using a CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay according to the manufacturer's instructions (Promega, France). CellTiter-Glo was added to 2.10^4 cells/well and then placed on an orbital shaker to induce cell lysis. Luminescence was determined using an EnVision luminescence plate reader (PerkinElmer, France). Background absorbance corresponded to luminescence values of culture media containing vehicle or compound. Results are presented as percentages of the control values obtained from vehicle-treated cells.

Transmission Electron Microscopy

Treated cells were collected, washed in PBS, fixed in 1.6 % glutaraldehyde for 12 h at 4 $^{\circ}$ C, post fixed in 1 % osmium tetroxide (OsO₄) for 1 h at room temperature, then serially dehydrated with ethanol. For transmission electron microscopy (TEM), ultrathin sections were cut on a Leica Ultra-CUT (Ultra-Microtome, Leica), stained with uranium acetate and lead citrate, then observed and photographed on a ZEISS 912 Omega TEM operating at 80 kV.

siRNA Transfection

Cells were transfected by electroporation using the AMAXA nucleofector device with the X005 program, and L transfection solution (LONZA, France). Anti-LC3 siRNA (siRNA LC3-A and siRNA LC3-B, 100 nM/10⁶ cells) were kindly provided by P. Auberger, (INSERM U895, Cell death differentiation and cancer team, Nice, France). Anti-SIRT2 siRNA (300 nM/10⁶ cells) were from Ambion ([®] AM16708, France). Scrambled siRNA from Ambion ([®] AM4611, France) was used as control. 48 h after transfection, cells were collected, lysed and assayed for protein expression by immunoblotting.

Statistical Analysis

Statistical analyses were done using ANOVA followed by Newman-Keuls test. A *p*-value < 0.05 was considered significant. All experiments were repeated at least thrice in an independent manner.

Results

Dual Dose-Dependent Inhibition of Resveratrol on GSC Proliferation and Survival

GSC exposure to 0–300 μ M of resveratrol for 24 h resulted in decreased numbers of viable cells in a dose-dependent fashion, with IC₅₀ values in the range of 150–200 μ M, as determined using the trypan blue exclusion assay (Fig. 1a). However, only GSCs treated with resveratrol concentrations above 150 μ M exhibited altered cell morphologies evoking cell death as observed under phase contrast microscopy (Fig. 1b). These results suggested that resveratrol did not induce GSC death at concentrations below 150 μ M. To evaluate cell death we performed FACS analysis on GSCs treated either with 100 or 300 μ M resveratrol. FACS analysis showed that the vast majority of GSCs underwent cell death in response to 300 μ M of resveratrol (Fig. 1c). On the opposite, 100 μ M resveratrol did not induce GSC death (Fig. 1c). Of note, metabolic activity via NAD(P)H production measured using reduction of WST-1 was robustly decreased in GSCs exposed to either 100 or

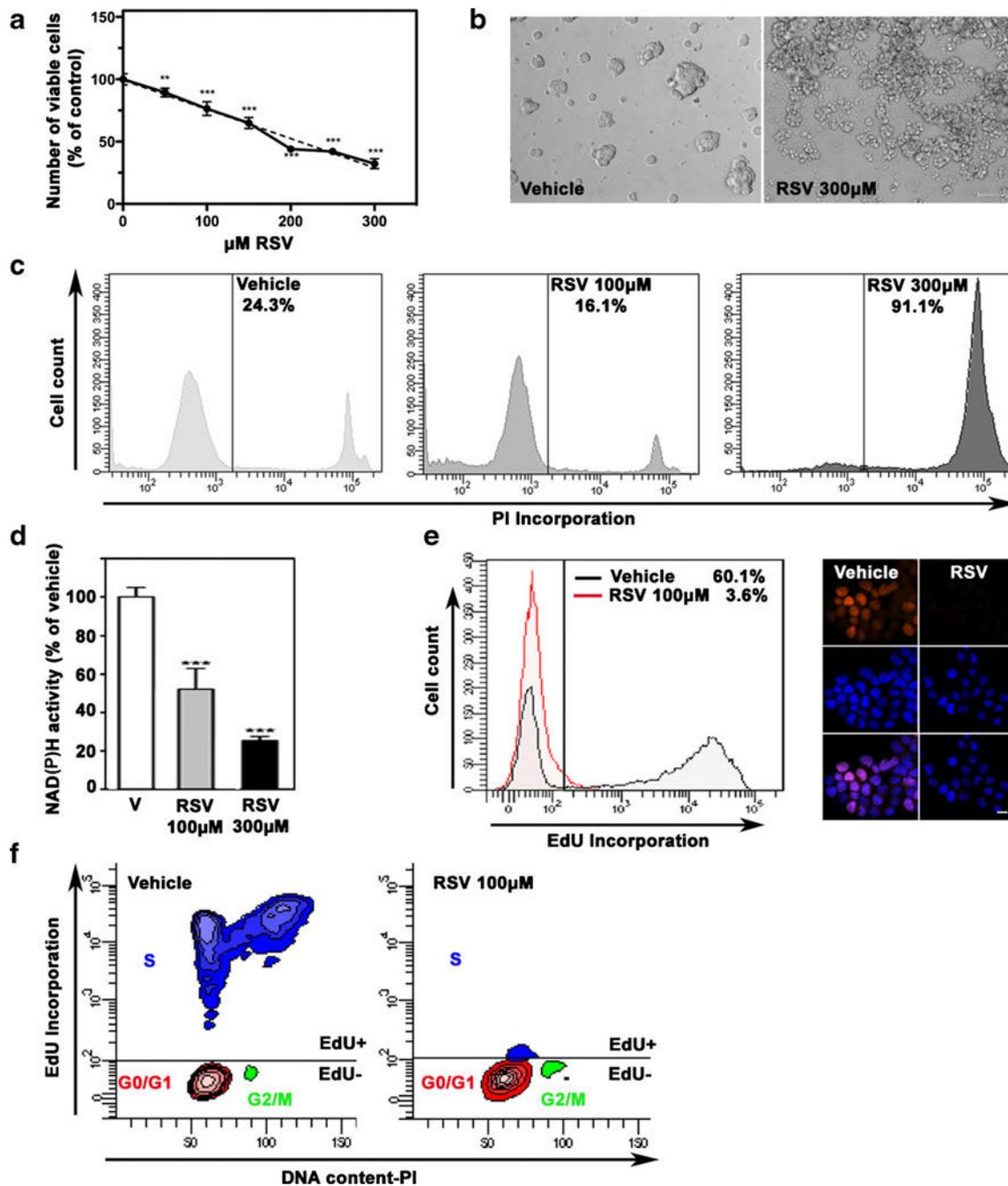


Fig. 1 Dual dose-dependent inhibition of resveratrol on GSC proliferation and survival. **a** Dose-dependent decrease in viable GSC number induced by resveratrol (RSV 0–300 μM , 24 h). Trypan blue exclusion assay, example of TG1 GSCs (mean \pm SD, $n=3$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, as compared with vehicle). **b** 300 μM resveratrol induces GSC morphological changes evoking cell death. Phase contrast microphotographs, OB1 GSCs. Bar=50 μM . **c** Resveratrol induces GSC death only at 300 μM . FACS analysis of propidium iodide (PI) incorporation, OB1

GSCs. **d** Resveratrol inhibits GSC metabolic activity at both 100 and 300 μM , as shown with NAD(P)H activity assay (mean \pm SD, $n=3$, $***p<0.001$ compared with vehicle (V)). **e** 100 μM resveratrol blocks GSC cell cycle. EdU incorporation in S-phase synthesis of the cell cycle was analyzed by FACS (left panel) and fluorescence microscopy (right panel, red signal EdU, blue DAPI). Bar=10 μm . **f** GSC cell cycle changes induced by 100 μM resveratrol, as shown by FACS analysis. RSV: resveratrol

300 μM resveratrol (Fig. 1d). Altogether, these results suggested that 100 μM resveratrol altered GSC proliferation. GSC cell cycle was therefore analyzed after incubation of the cells for 24 h with the thymidine substitute EdU (10 μM), which is

incorporated into newly synthesized DNA. FACS analysis showed that 100 μM resveratrol exerted a robust inhibition of GSC proliferation, the numbers of cells having incorporated EdU being reduced 5.6 ± 1.9 fold (mean \pm SD, $n=4$) (Fig. 1e).

Refined cell cycle analysis using EdU to label cells having undergone DNA replication, and PI as an index of DNA content, showed that in presence of 100 μ M resveratrol, GSCs accumulate in the G0/G1 phase with a concomitant depletion of cells in the S phase (52–57 % cells in S phase in control condition versus 7–9 % cells in resveratrol-treated cultures) (Fig. 1f).

Resveratrol Inhibits GSC Proliferation and Survival but Sparing Normal NSCs

Resveratrol has been repetitively reported to be either innocuous or beneficial for normal non-cancerous neural cells but its effects on normal human NSCs remain unexplored. We therefore compared the proliferation and survival of five GSC cultures (OB1, TG1, TG1N, TG10 and TG16) with those of human NSCs following exposure to 100 μ M and 300 μ M resveratrol. Resveratrol did not modify the proliferation and viability of human NSCs (Fig. 2a and b, respectively) nor their morphology (data not shown). On the opposite, and as expected, resveratrol inhibited the proliferation of all GSC cultures at 100 μ M (Fig. 2a), and triggered severe GSC death at 300 μ M (Fig. 2b). Of note, resveratrol effects on GSCs were independent from the transcription factor p53, a well-known regulator of cell survival. Resveratrol effects were observed in GSCs bearing either a wild type (OB1, TG1, TG1N), or a mutant form of *TP53* (TG10, TG16) [23] (Fig. 2a and b).

Finally, we verified whether resveratrol could act on GSCs once they have been induced to lose their stem and tumor-initiating properties. For this purpose, we used GSCs cultured in serum-supplemented medium, which is known to result in loss of stem-like and tumorigenic properties [23, 28]. We also explored resveratrol effects on GSCs transduced with the cluster of microRNAs, miR-302-367 that commits GSCs to an irreversible non stem-like state, and suppress their ability to initiate tumors [7]. Our results showed that the proliferation and the survival of GSCs having lost their properties were also inhibited in presence of 100 or 300 μ M resveratrol, respectively (Fig. 2c and d).

100 μ M resveratrol inducing only cell cycle blockade without altering GSC survival, we envisaged the possibility that autophagy could protect the cells against cell death, as previously reported in other types of cancer cells [29, 30]. We used LC3-II expression as a marker of autophagy, a cell process allowing the degradation of superfluous or damaged proteins and organelles through the formation of autophagolysosomes. LC3-II results from the processing of LC3-I and is required for the formation of autophagolysosomes [31]. Western blot analysis with an antibody recognizing both forms of the protein, revealed an up-regulation of LC3-II in resveratrol-treated cells (Fig. 3a). Resveratrol did not induce LC3-II expression in NSCs (Fig. 3a). Presence of autophagosomes/autophagolysosomes was observed using transmission electron microscopy of GSCs treated with 100 μ M resveratrol

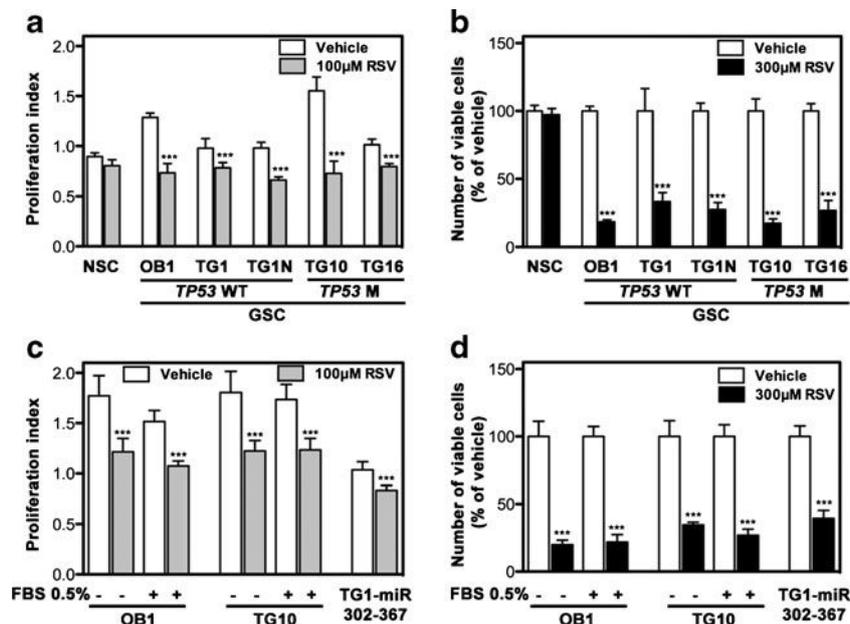


Fig. 2 Resveratrol inhibits GSC proliferation and survival whereas sparing NSCs. **a and b** Comparative effects of resveratrol on NSC and GSC proliferation (**a**) and survival (**b**). Viable cell numbers were determined using trypan blue exclusion assay. Note that all GSCs tested were sensitive to the inhibitory effects of resveratrol regardless of the presence of a wild-type (WT) or mutant (M) form of *TP53* (mean \pm SD, $n=3$,

*** $p<0.001$ as compared with the respective vehicle condition). **c and d** Resveratrol inhibits the proliferation (**c**) and survival (**d**) of GSCs having lost their stem properties, either in response to serum (FBS) treatment, or to viral transduction of the micro-RNA cluster miR-302-367 (mean \pm SD, $n=3$, *** $p<0.001$ as compared with the respective vehicle condition). See text for further details

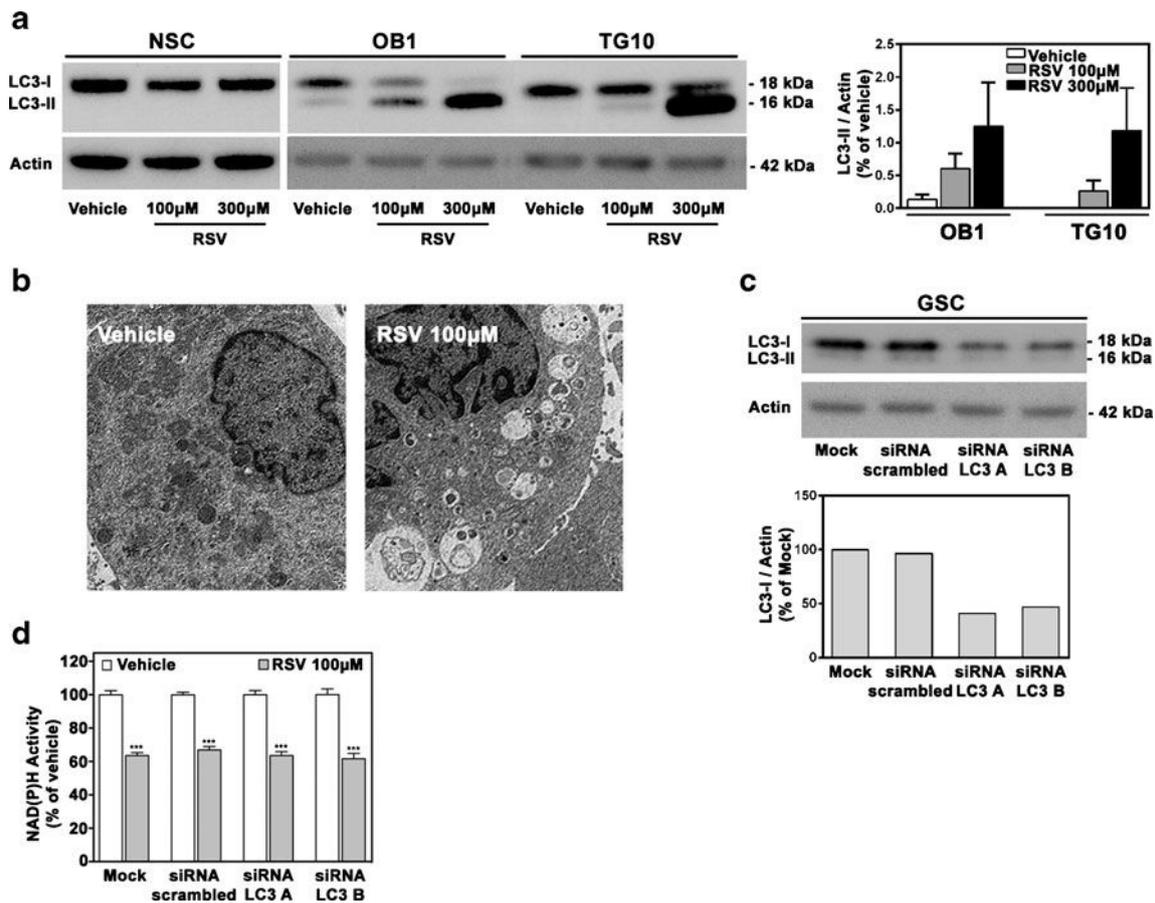


Fig. 3 Resveratrol induces autophagy in GSCs. **a** Resveratrol induces LC3-II formation in GSCs but not in NSCs. *Left panel*: total cell lysates from NSCs and GSCs were analyzed for LC3-I and LC3-II expression by immunoblotting. Actin was used as a loading control. *Right panel*: densitometric analysis of LC3-II immunoreactive signals (mean \pm SD, $n=3$). **b** Autophagosomes were observed by transmission electronic microscopy in GSCs treated with 100 μ M resveratrol. **c** Decreased

protein expression of LC3 in GSCs transfected with anti-LC3 siRNAs, as compared to mock-transfected GSCs or to GSCs transfected with scrambled siRNA (*top panel*) and densitometric analysis of LC3 immunoreactive signal (*bottom panel*). **d** Down-regulated expression of LC3 does not modify resveratrol inhibitory effect on metabolic activity. NAD(P)H activity assay (mean \pm SD, $n=3$, *** $p<0.001$ as compared with the respective vehicle condition)

(Fig. 3b). Inhibition of LC3 expression with siRNA transfection (Fig. 3c) did not modify GSC response to either 100 μ M (Fig. 3d) or 300 μ M resveratrol (not shown). These results indicate that autophagy does not interfere with resveratrol action on GSCs.

SIRT2 Participates in Resveratrol-Induced Cell Cycle Inhibition

To explore the mechanisms underlying resveratrol effects, we focused our attention on the family of NAD-dependent deacetylases sirtuins, one of its members SIRT1 having been repetitively shown to constitute a preferential resveratrol target at least in normal cells [32]. Western blot analysis showed that SIRT1 and SIRT3 were expressed by both GSCs and NSCs whereas SIRT2 expression was restricted to GSCs (Fig. 4a). This observation suggested a role for SIRT2 in mediating resveratrol effects in GSCs. We first tested this hypothesis using pharmacological inhibitors of sirtuins. Sirtinol, a non-

selective sirtuin inhibitor targeting both SIRT1 and SIRT2, reverted the inhibition of GSC proliferation induced by resveratrol (Fig. 4b). EX527, a specific inhibitor of SIRT1 activity, failed to restore GSC proliferation (Fig. 4b). On the opposite, the specific SIRT2 inhibitor AGK2 prevented the inhibitory effect of resveratrol on GSC proliferation, whereas its inactive isomer AGK7 had no effect (Fig. 4b). All SIRT inhibitors failed to restore resveratrol-induced cell death (Fig. 4c). To further assay the involvement of SIRT2 in resveratrol-induced inhibition of GSC proliferation, we down-regulated SIRT2 expression using specific siRNAs. SIRT2 protein levels were reduced 2.7 fold in GSCs transfected with SIRT2 siRNAs, as compared to GSCs transfected with scrambled siRNAs (Fig. 4d). Analysis of cell proliferation by cell counting showed that inhibition of SIRT2 expression decreased by half the deleterious effect of resveratrol on GSC proliferation (Fig. 4e). The targeting of SIRT2 by resveratrol was further verified by examination of the

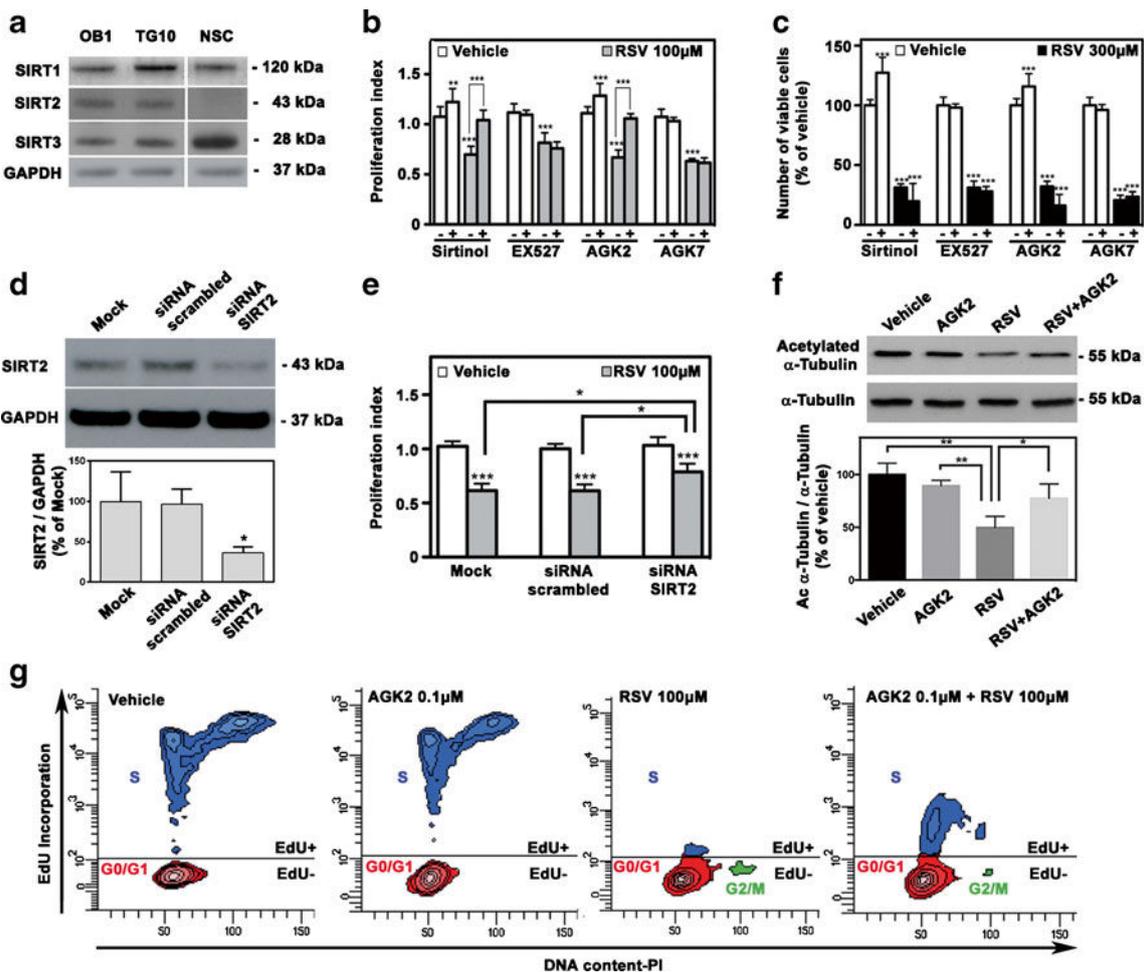


Fig. 4 Resveratrol-induced GSC cell cycle arrest depends on SIRT2. **a** Total cell lysates from NSCs and GSCs were analyzed for SIRT1, SIRT2 and SIRT3 expression by immunoblotting. GAPDH was used as a loading control. Note that NSCs do not express SIRT2. **b** Pharmacological inhibition of SIRT2 counteracts the inhibitory effects exerted by 100 μ M resveratrol on GSC proliferation (mean \pm SD, $n=3$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). Statistical significance, as compared to the vehicle condition—is shown with stars on top of the bars. Statistical significance, as compared to resveratrol-treated cells with no inhibitor is shown with stars on top of the lines joining the bars. **c** Resveratrol-induced GSC death is maintained in presence of sirtuin inhibitors (mean \pm SD, $n=3$, *** $p<0.001$, as compared to the respective vehicle condition). **d** Decreased expression of SIRT2 protein in GSCs transfected with anti-SIRT2 siRNA, as compared to mock transfected

GSCs or to GSCs transfected with scrambled siRNA. *Bottom panel:* densitometric analysis (mean \pm SD, $n=3$, * $p<0.05$ as compared with mock-transfected GSCs or GSCs transfected with scrambled siRNA). **e** Down-regulated expression of SIRT2 counteracts resveratrol inhibitory effects on GSC proliferation (mean \pm SD, $n=3$, * $p<0.05$, *** $p<0.001$). Representation of the statistical comparisons as in **b**. **f** Resveratrol promotes the deacetylation of α -tubulin, a substrate of SIRT2. *Bottom panel:* densitometric analysis (mean \pm SD, $n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$). **g** Blockade of SIRT2 activity with AGK2 prevents resveratrol-induced GSC cell cycle arrest. Cell cycle profile was analyzed by FACS on GSCs exposed to EdU prior to be fixed and labeled with propidium iodide (PI). In **b**, **c** and **e**, viable cell numbers were determined using trypan blue exclusion assay

acetylation levels of α -tubulin, a SIRT2 substrate [33]. Immunoblotting with antibodies recognizing either all forms of α -tubulin or its acetylated form (acetylated K40) showed that resveratrol treatment resulted in decreased levels of acetylated- α -tubulin, and AGK2 prevented resveratrol-induced α -tubulin deacetylation (Fig. 4f). Finally, we evaluated whether blockade of SIRT2 activity with AGK2 prevented resveratrol-induced cell cycle arrest of GSCs using EdU and PI incorporation followed by FACS analysis. AGK2 was without effect on the cell cycle of vehicle-treated cells. On the opposite, treatment of GSCs with

AGK2 reduced the inhibition of cell cycle progression in resveratrol-treated GSCs, increasing the numbers of cells in S phase from 1.4 to 2 fold (Fig. 4g).

Resveratrol Induces GSC Necrosis by a SIRT2 Independent Mechanism

To determine the type of cell death underwent by GSCs treated with 300 μ M resveratrol, we first evaluated a possible involvement of apoptosis, a mode of death requiring stable

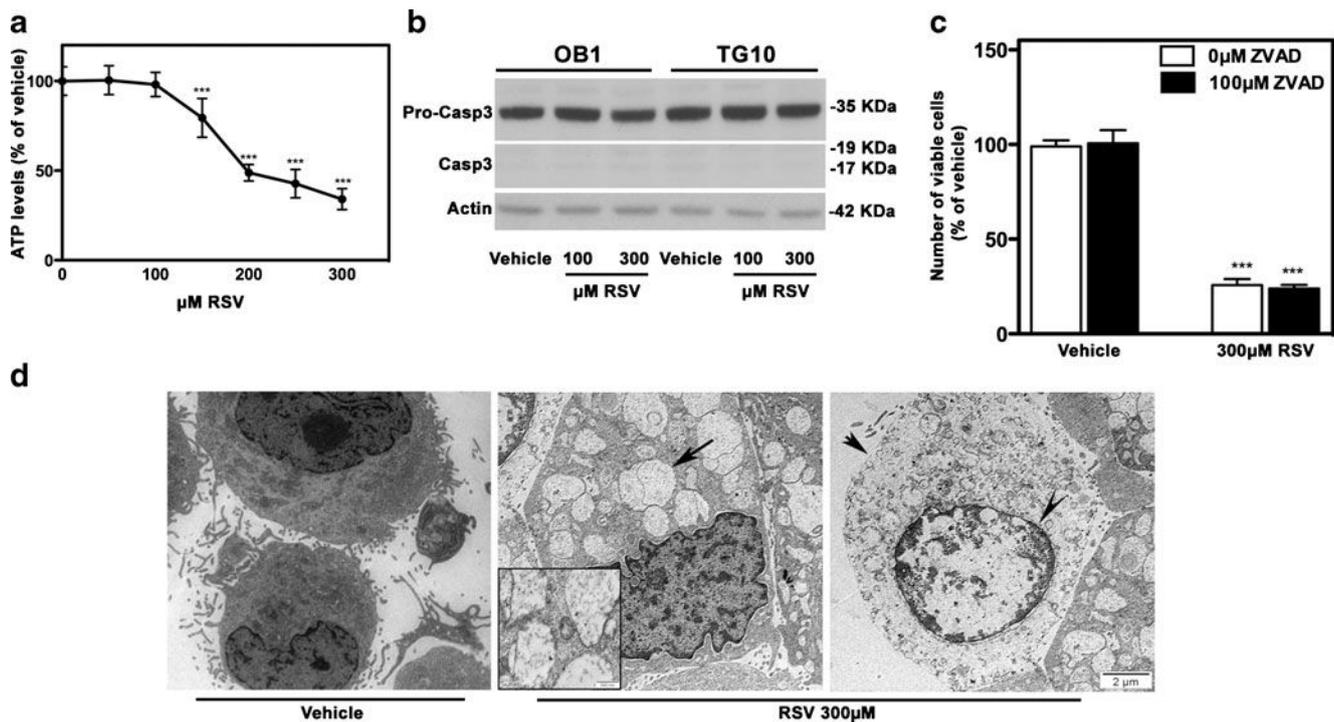


Fig. 5 300 μM resveratrol induces GSC necrosis. **a** Resveratrol inhibits GSC ATP production in a dose-dependent manner ($n=3$, $***p<0.001$ as compared with vehicle condition). **b** Resveratrol does not induce caspase-3 activation. Illustration of 3 independent experiments. **c** The pan-caspase inhibitor zVAD-fmk (ZVAD) does not prevent resveratrol-induced GSC death. GSCs were treated for 30 min with ZVAD (100 μM) prior additional exposure to resveratrol for 24 h. Viable cell numbers were

determined using trypan blue exclusion assay ($n=3$, $***p<0.001$, as compared with the respective vehicle condition). **d** Electronic microscopy images illustrating GSC morphological changes following 24 h exposure to 300 μM resveratrol. Note the swelling of organelles (arrow) and fragmentation of nuclear and cell membrane (short arrow and arrowheads, respectively). Bar=2 μm and 500 nm in insert

ATP concentrations and caspase activation [34], regardless of the specific sub-apoptotic pathway used by the cell. Accordingly, we measured ATP production and observed a robust ATP depletion in GSCs only within the 200–300 μM resveratrol concentration range (Fig. 5a), as expected for a mode of death independent from apoptosis. We then sought for caspase mobilization that governs subsequent signaling cascades ending up in cell apoptosis. We first focused on caspase-3, this caspase being the most frequently shown to be activated during apoptosis, regardless of the cell type and the apoptosis-inducing signal considered. The results showing unchanged levels of activated caspase-3 (Fig. 5b), we used the broad-spectrum pan-caspase inhibitor zVAD-fmk to verify whether other caspases could be involved in resveratrol-induced cell death. This pan-caspase inhibitor did not provide any protection against resveratrol-induced GSC death (Fig. 5c). Altogether, these results show that resveratrol does not trigger GSC apoptosis. Characterization of the morphology of 300 μM resveratrol-treated cells by transmission electron microscopy showed numerous morphological changes including grossly swollen organelles, and fragmentation of the nuclear and cell membranes (Fig. 5d). These morphological alterations, associated with the drop in ATP levels characteristic of cell necrosis [34] indicate, that GSCs undergo necrosis in response to 300 μM resveratrol.

Discussion

The results of this study show that resveratrol exerts a dual effect on glioblastoma cells endowed with stem-like properties, inhibiting cell cycling at doses lesser than 150 μM and triggering necrosis above 150 μM, whereas sparing normal human NSCs. Pharmacological inhibition of SIRT2 with the AGK2 compound, and down-regulated SIRT2 expression with siRNAs disclose a role for SIRT2 activity as a mediator of the inhibitory action of resveratrol on GSC cell cycle. On the opposite, GSC necrosis induced by higher doses of resveratrol is independent from sirtuin activity.

Previous studies on the adverse effects of resveratrol on cancer cell growth have disclosed interactions with multiple molecular targets in several different cancer cells of hematological, epithelial and central nervous system origins [35, 36]. Accordingly, resveratrol exerts varied actions on cancer cell behavior that range from cell cycle disruption to induction of apoptosis or necrosis [17, 37–40]. Similarly to the GSCs studied in the present work, the U87 and U251 glioma cell lines have been reported to respond to 100–300 μM resveratrol with cell cycle arrest, and induction of autophagy. However, the role of autophagy differs between GSCs and these classic glioma cell lines. Cell cycle arrest in resveratrol-treated

U87 and U251 cells depends on the induction of autophagy, the induction of which concomitantly prevents resveratrol-induced apoptosis [17, 41]. In GSCs, down-regulated expression of the key component of autophagolysosomes LC3 did not modify GSC response to resveratrol. Resveratrol (50–200 μM) was recently reported to sensitize GSCs to irradiation-induced death [42]. This effect was correlated with an inhibition of STAT3 signaling in the presence of resveratrol, STAT3 being known for its involvement in the maintenance of GSC properties. In this study using CD133+ GSCs, resveratrol did not affect LC3-II levels, the high LC3-II levels already present in control conditions suggesting the existence of a metabolic stress, as expected in CD133 expressing cells [43]. Additional differences in cell contexts could account for variations in resveratrol actions, such as different abilities in resveratrol biotransformation, especially through its metabolism in sulfate and glucuronide conjugates [18, 38, 44]. They could also differ in the expression of ABC transporters, xenobiotic protectors known to constrain resveratrol bioavailability [45], and highly active in the GSCs used in the present study (team Glial Plasticity, unpublished results). Although further studies are required to pinpoint the source of these variable responses of GSCs to resveratrol, these results suggest that resveratrol acts in a variety of manners and mechanisms on GSCs as it does on classic glioma cell lines. All these pleiotropic actions limit tumor progression. Resveratrol was reported to induce U251 cell apoptosis with inhibition of the pro-survival PI3K/Akt/mTOR transduction pathway [19]. Study of T98G and A172 glioma cells, which bear a heterozygous *TP53* mutation, has shown an alternative mechanism of action. In these cells, resveratrol induces apoptosis by restoring a Notch1-p53 signaling pathway [20]. The present results show that resveratrol can inhibit cell cycle and survival of GSCs bearing distinct genomic alterations [23, 25] (mutant or wild-type *TP53* and/or mutant or wild-type *PTEN*, a tumor suppressing gene which regulates the activity of the PI3K/Akt pathway known to be essential for GSC survival) [26, 46]. However, resveratrol effects appearing to critically depend on the whole metabolic capacity of the cell under scrutiny, as well as on the set of target proteins expressed by the cells, we cannot exclude the possibility that additional resveratrol targets are expressed in the GSCs used in this study.

Our results additionally showed that survival inhibition of GSCs induced by 300 μM resveratrol occurs through necrosis rather than apoptosis, as previously described for C6 rat glioma cell line [38]. Contrary to apoptosis, necrosis is an energy-independent death process characterized by loss of membrane integrity, cell swelling and ultimately cell lysis. GSCs exposed to 300 μM resveratrol exhibited all characteristics of necrosis with ATP depletion, organelle and cell swelling, and membrane disruption [34, 47]. We did not observe any of the characteristics of apoptosis, including cytoplasmic shrinking, nuclear condensation (as shown by electronic microscopy), or

caspace activation (as shown by the lack of cell rescue with the pan-caspase inhibitor ZVAD or caspase-3 immunoblotting).

Necrosis is predominantly viewed as a passive, unorganized death pathway [48], although some forms of programmed necrosis have been reported. A very recent report has noteworthy placed SIRT2 at the core of programmed necrosis [14]. In GSCs, blockade of SIRT2 expression or enzymatic activity did not counteract resveratrol-induced necrosis, suggesting that in that case necrosis is likely the result of a disordered catastrophic response of the cells to severe energy depletion. On the opposite, our results show that SIRT2 mediates resveratrol inhibitory effect on GSC cell cycle. They are coherent with previous reports of resveratrol effect on human SIRT2 in vitro. Using recombinant hSIRT2 or the inactive mutant hSIRT2N168A, and α -tubulin as a substrate, Suzuki et al. [49] have shown that 100 μM resveratrol robustly stimulated hSIRT2 activity. Likewise, Fan et al. [50], using recombinant SIRT2 and Fmoc-labeled peptides as substrates reported SIRT2 activation with 100 μM resveratrol. Regarding sirtuin pharmacological inhibitors, Outeiro et al. [51] have reported that AGK2 inhibits recombinant SIRT2 activity in vitro with an IC₅₀ of 3.5 μM , whereas only 0.2 μM AGK2 are required to fully reverse the SIRT2-dependent deleterious effect of mutated α -synuclein expression in dopaminergic neurons. Post-translational modifications of SIRT2, and/or co-factors are likely to underlie the differences observed in AGK2 efficiency, but the precise molecular mechanism remains to be elucidated.

Either down-regulated expression of SIRT2 or pharmacological blockade of its enzymatic activity counteracted resveratrol-induced cell cycle arrest. The results of the present study are in accordance with the reported correlation between SIRT2 expression with cell cycle progression, and the peak of SIRT2 expression observed during mitosis [52]. Altogether, our results show that resveratrol can target members of the sirtuin family in GSCs, as in normal neural cells [53, 54]. With respect to NSCs, we did not observe any positive or negative change in cell behavior following resveratrol treatment, although these cells had high protein levels of at least two members of the sirtuin family, SIRT1 and SIRT3. This observation is in accordance with the lack of effect of resveratrol on wild-type murine NSCs [55]. On the opposite, resveratrol prevents depletion in NSC numbers in mice deficient for the metalloprotease Zmpste24 responsible for prelamin A maturation, a model of the syndrome of premature aging, progeria [55]. In mutant NSCs, resveratrol restores SIRT1 association with nuclear matrix, and hence its enzymatic activity, both decreased in the presence of prelamin A. Sirtuins have received numerous credits as supporting the beneficial effects of resveratrol in normal cells whereas their involvement in resveratrol deleterious effect on transformed cells was the matter of only a single report where inhibition of their proliferation was associated with SIRT1-dependent AMPK activation [56]. We now provide a second example for the involvement of a

sirtuin, namely SIRT2, in a deleterious effect of resveratrol on cancerous cells, here on GSCs. These data of the literature, associated with the present results suggest that the type of response of a given cell to resveratrol does not merely rely on the presence or absence of a given protein, but rather on the existence of complex protein interactions that remain to be identified. They further stretch out the importance of the cell context in determining the outcome of resveratrol effects.

Acknowledgments The authors thank Amélia Dias-Morais for excellent technical assistance, and are grateful to Dr P. Auberger (INSERM U895, Nice, France) for providing LC3 siRNA. This work was supported by ARC and by Région Ile de France-Canceropôle (CT and EAE fellowships), and by CAPES/COFECUB (LGD and AB fellowships).

Conflict of Interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, *352*(10), 987–996.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., et al. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, *444*(7120), 756–760.
- Diehn, M., & Clarke, M. F. (2006). Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance. *Journal of the National Cancer Institute*, *98*(24), 1755–1757.
- Chen, J., Li, Y., Yu, T. S., et al. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, *488*(7412), 522–526.
- Thirant, C., Bessette, B., Varlet, P., et al. (2011). Clinical relevance of tumor cells with stem-like properties in pediatric brain tumors. *PLoS ONE*, *6*(1), e16375.
- Zbinden, M., Duquet, A., Lorente-Trigos, A., et al. (2010). NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *The EMBO Journal*, *29*(15), 2659–2674.
- Fareh, M., Turchi, L., Virolle, V., et al. (2012). The miR 302–367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. *Cell death and differentiation*, *19*(2), 232–244.
- Eyler, C. E., & Rich, J. N. (2008). Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(17), 2839–2845.
- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., & Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, *24*(5A), 2783–2840.
- Narita, K., Hisamoto, M., Okuda, T., & Takeda, S. (2011). Differential neuroprotective activity of two different grape seed extracts. *PLoS ONE*, *6*(1), e14575.
- Sun, A. Y., Wang, Q., Simonyi, A., & Sun, G. Y. (2010). Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology*, *41*(2–3), 375–383.
- Milne, J. C., Lambert, P. D., Schenk, S., et al. (2007). Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*, *450*(7170), 712–716.
- Vaziri, H., Dessain, S. K., NgEaton, E., et al. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, *107*(2), 149–159.
- Narayan, N., Lee, I. H., Borenstein, R., et al. (2012). The NAD-dependent deacetylase SIRT2 is required for programmed necrosis. *Nature*, *492*(7428), 199–204.
- Hiratsuka, M., Inoue, T., Toda, T., et al. (2003). Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *309*(3), 558–566.
- Zhang, W., Murao, K., Zhang, X., et al. (2010). Resveratrol represses YKL-40 expression in human gliomaU87 cells. *BMC Cancer*, *10*, 593.
- Filippi-Chiela, E. C., VillodreES, Z. L. L., & Lenz, G. (2011). Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS ONE*, *6*(6), e20849.
- Shu, X. H., Li, H., Sun, X. X., et al. (2011). Metabolic patterns and biotransformation activities of resveratrol in human glioblastoma cells: relevance with therapeutic efficacies. *PLoS ONE*, *6*(11), e27484.
- Jiang, H., Zhang, L., Kuo, J., et al. (2005). Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, *4*(4), 554–561.
- Lin, H., Xiong, W., Zhang, X., et al. (2011). Notch-1 activation-dependent p53 restoration contributes to resveratrol-induced apoptosis in glioblastoma cells. *Oncology Reports*, *26*(4), 925–930.
- Lin, C. J., Lee, C. C., Shih, Y. L., et al. (2012). Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy. *Free Radical Biology and Medicine*, *52*(2), 377–391.
- Huang, H., Lin, H., Zhang, X., & Li, J. (2012). Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF- κ B-dependent pathway. *Oncology Reports*, *27*(6), 2050–2056.
- Silvestre, D. C., Pineda, J. R., Hoffschir, F., et al. (2011). Alternative lengthening of telomeres in human glioma stem cells. *Stem Cells*, *29*(3), 440–451.
- Surena, A. L., de Faria, G. P., Studler, J. M., et al. (2009). DLG1/SAP97 modulates transforming growth factor alpha bioavailability. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1793*(2), 264–272.
- Patru, C., Romao, L., Varlet, P., et al. (2010). CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glioblastoma. *BMC Cancer*, *10*, 66.
- Galan-Moya, E. M., Le Guelte, A., Lima Fernandes, E., et al. (2011). Secreted factors from brain endothelial cells maintain glioblastoma stem-like cell expansion through the mTOR pathway. *EMBO Reports*, *12*(5), 470–476.
- Thirant, C., Galan-Moya, E. M., Dubois, L. G., et al. (2012). Differential proteomic analysis of human glioblastoma and neural stem cells reveals HDGF as a novel angiogenic secreted factor. *Stem Cells*, *30*(5), 845–853.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., et al. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, *9*(5), 391–403.
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., et al. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, *10*(1), 51–64.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., & White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *7*(12), 961–967.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., et al. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *The EMBO Journal*, *19*(21), 5720–5728.
- Baur, J. A. (2010). Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic. *Mechanisms of Ageing and Development*, *131*(4), 261–269.

33. North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., & Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Molecular Cell*, *11*(2), 437–444.
34. Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S., & Nicotera, P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, *185*(8), 1481–1486.
35. Athar, M., Back, J. H., Tang, X., et al. (2007). Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *224*(3), 274–283.
36. Gagliano, N., Aldini, G., Colombo, G., et al. (2010). The potential of resveratrol against human gliomas. *Anti-cancer Drugs*, *21*(2), 140–150.
37. Aziz, M. H., Nihal, M., Fu, V. X., Jarrard, D. F., & Ahmad, N. (2006). Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Molecular Cancer Therapeutics*, *5*(5), 1335–1341.
38. Michels, G., Wätjen, W., Weber, N., et al. (2006). Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells. *Toxicology*, *225*(2–3), 173–182.
39. Vanamala, J., Reddivari, L., Radhakrishnan, S., & Tarver, C. (2010). Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways. *BMC Cancer*, *10*, 238.
40. Puissant, A., Robert, G., Fenouille, N., et al. (2010). Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Research*, *70*(3), 1042–1052.
41. Li, J., Qin, Z., & Liang, Z. (2009). The prosurvival role of autophagy in Resveratrol-induced cytotoxicity in human U251 glioma cells. *BMC Cancer*, *9*, 215.
42. Yang, Y. P., Chang, Y. L., Huang, P. I., et al. (2012). Resveratrol suppresses tumorigenicity and enhances radiosensitivity in primary glioblastoma tumor initiating cells by inhibiting the STAT3 axis. *Journal of Cellular Physiology*, *227*(3), 976–993.
43. Griguer, C. E., Oliva, C. R., Gobin, E., et al. (2008). CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PLoS ONE*, *3*(11), e3655.
44. Wenzel, E., Soldo, T., Erbersdobler, H., & Somoza, V. (2005). Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, *49*(5), 482–494.
45. Planas, J. M., Alfaras, I., Colom, H., & Juan, M. E. (2012). The bioavailability and distribution of trans-resveratrol are constrained by ABC transporters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *527*(2), 67–73.
46. Hambardzumyan, D., Squatrito, M., Carbajal, E., & Holland, E. C. (2008). Glioma formation, cancer stem cells, and akt signaling. *Stem Cell Reviews*, *4*(3), 203–210.
47. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, *16*(1), 3–11.
48. Edinger, A. L., & Thompson, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, *16*(6), 663–669.
49. Suzuki, K., & Koike, T. (2007). Resveratrol abolishes resistance to axonal degeneration in slow Wallerian degeneration (WldS) mice: activation of SIRT2, an NAD-dependent tubulin deacetylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *359*(3), 665–671.
50. Fan, Y., Ludewig, R., & Scriba, G. K. (2009). 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-labeled peptides as substrates in a capillary electrophoresis-based assay for sirtuin enzymes. *Analytical Biochemistry*, *387*(2), 243–248.
51. Outeiro, T. F., Kontopoulos, E., Altmann, S. M., et al. (2007). Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science*, *317*(5837), 516–519.
52. Inoue, T., Hiratsuka, M., Osaki, M., & Oshimura, M. (2007). The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. *Cell Cycle*, *6*(9), 1011–1018.
53. Anekonda, T. S. (2006). Resveratrol—a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Research Reviews*, *52*(2), 316–326.
54. Pfister, J. A., Ma, C., Morrison, B. E., & D'Mello, S. R. (2008). Opposing effects of sirtuins on neuronal survival: SIRT1-mediated neuroprotection is independent of its deacetylase activity. *PLoS ONE*, *3*(12), e4090.
55. Liu, B., Ghosh, S., Yang, X., et al. (2012). Resveratrol rescues SIRT1-dependent adult stem cell decline and alleviates progeroid features in laminopathy-based progeria. *Cell Metabolism*, *16*(6), 738–750.
56. Lin, J. N., Lin, V. C., Rau, K. M., et al. (2010). Resveratrol modulates tumor cell proliferation and protein translation via SIRT1-dependent AMPK activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(3), 1584–1592.

C. Conclusion

Nos résultats ont montré que le resvératrol exerce un effet cytostatique à faibles doses et un effet cytotoxique à fortes doses sur les GSC de l'adulte. Par contre, le resvératrol ne modifie pas la prolifération et la survie des CSN. Ces résultats sont en accord avec la littérature, obtenus avec des lignées classiques de glioblastomes.

L'effet cytostatique du resvératrol se traduit par un blocage en phase S (phase de synthèse de l'ADN) du cycle cellulaire. Le mécanisme qui sous-tend cet effet met en jeu une déacétylase, SIRT2, spécifiquement exprimée dans les GSC mais absente dans les NSC. L'inhibition de l'expression et/ou de l'activité de SIRT2 grâce à des siRNA et/ou des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques, nous a permis de déterminer le mécanisme d'action. Nos résultats ont ainsi montré que le resvératrol induit une déacétylation de la tubuline- α , une cible privilégiée de SIRT2, tandis que l'inhibition de SIRT2 par un agent pharmacologique rétablit cette acétylation.

L'effet cytotoxique du resvératrol se traduit par une mort nécrotique, dont le mécanisme reste encore à déterminer.

Les voies de signalisation activées par le resvératrol dépendraient donc à la fois du système cellulaire étudié et de la dose utilisée.

Le resvératrol se révèle donc capable d'inhiber la prolifération et la survie des GSC comme de lignées classiques de glioblastomes dépourvues de propriétés souches, bien que les mécanismes mis en jeu diffèrent. Nos résultats montrent par ailleurs la possibilité de cibler les cellules souches cancéreuses tout en épargnant les cellules souches normales.

**Partie 3 : Méthylations de l'histone H3 et contrôle
épigénétique des propriétés des cellules souches de gliomes**

A. Introduction et objectif de l'étude menée

Les gliomes sont les tumeurs primitives les plus fréquentes du cerveau et restent de mauvais pronostic en raison de l'inefficacité des traitements actuels: 4ème cause de mort par cancer chez l'adulte, 2ème chez l'enfant (*Stupp et al., 2005*). A partir de certains gliomes de l'adulte, les glioblastomes, plusieurs équipes, dont la nôtre, ont caractérisé des cellules souches cancéreuses (CSC) (*Galli et al., 2004 ; Patru et al., 2010*). Nous avons de plus caractérisé des CSC à partir de gliomes de haut grade de l'enfant, en particulier les gliomes infiltrant du tronc cérébral (*Thirant et al., 2011*). Ces CSC peuvent fournir tous les sous-types cellulaires qui composent la tumeur, cellules endothéliales incluses. Leur greffe dans des cerveaux murins aboutit à une copie phénotypique de la tumeur humaine d'origine. Leurs propriétés fonctionnelles sont associées à une signature moléculaire combinant marqueurs de cellules souches neuronales, embryonnaires, et mésenchymateuses (*Tabatabai, 2011*).

Un nombre croissant d'études indique que le comportement tumoral, et une grande partie de la résistance aux thérapies, est dicté par des cellules initiatrices de gliomes (GSC) (*Chen et al., 2012 ; Bao et al., 2006*). Cibler les GSC et leurs propriétés souches constitue donc un enjeu thérapeutique majeur. Une solution pertinente pour cibler les GSC est de les forcer à quitter l'état souche. Dans cet état «différencié», les cellules perdent leur tumorigénicité et deviennent vulnérables aux traitements existants (*Piccirillo et al., 2006*). Mais pour devenir une stratégie thérapeutique pertinente, cette perte de l'état souche doit être irréversible. Or, différentes études, dont celles de l'équipe, montrent que les GSC présentent une plasticité phénotypique majeure sous l'influence de signaux environnementaux. Les résultats obtenus par l'équipe en utilisant le sérum, l'agent de différenciation classique des GSC (*Galli et al., 2004*), montrent de plus que les GSCs peuvent perdre mais aussi retrouver leurs propriétés souches et tumorigènes (*Fareh et al., 2012*). Ces observations nous ont conduit à rechercher les mécanismes épigénétiques susceptibles de rendre compte du caractère réversible des propriétés des GSC. Parmi les différentes modifications épigénétiques connues à ce jour, nous avons d'abord axé notre attention sur les micro-ARN (miR). Nos travaux réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr T. Virolle (Inserm U898, Nice, France) ont abouti à l'identification d'un groupe de miR (miR-302-367) exprimé de novo par les GSC en réponse à une exposition au sérum. Son expression est suffisante non seulement pour inhiber les propriétés souches des GSC mais aussi leurs propriétés initiatrices de tumeurs, la transduction

lentivirale du groupe de miR dans les GSC bloquant leur capacité à initier une tumeur après leur greffe dans le striatum de souris immunodéficientes (Fareh et al, 2012). La perte des propriétés des GSC induite par miR-302-367 est accompagnée par la répression du réseau moléculaire formé par SHH-GLI-Nanog, nécessaire au maintien des propriétés souches des GSC (Zbinden et al., 2010). Cette répression est liée à un effet direct du groupe de miR sur l'ARNm du récepteur de chimiokine CXCR4 (Fareh et al, 2012). L'effet suppresseur de tumeur exercé par miR-302-367 constitue un mode entièrement nouveau de contrôle des propriétés des GSC. Il offre de plus la possibilité d'identifier les mécanismes qui régulent le maintien ou la perte des propriétés souches et tumorigènes des GSC. A l'aide du modèle formé par la lignée de GSC TG1 issue d'un glioblastome de l'adulte (Patru et al, 2010, Thirant et al, 2011), et de sa contrepartie dépourvue de propriétés souches et tumorigènes, TG1-miR-302-367, nous avons déjà pu identifier des altérations de voies métaboliques qui reproduisent certains des effets de miR-302-367 en inhibant l'activité d'enzymes impliqués dans les régulations épigénétiques de la transcription. Ces résultats, dont la rédaction est en cours, associés à l'observation de la capacité des GSC à subir des cycles successifs de perte et de gain de leurs propriétés, sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle le caractère « souche et tumorigène » est un état fonctionnel dépendant de signaux environnementaux. Selon ce modèle, les changements progressifs du microenvironnement favorisent des oscillations successives entre perte et gain du caractère souche, qui sont les moteurs du développement de la tumeur et de sa résistance thérapeutique. Ce caractère réversible des propriétés des GSC met en avant l'importance probable des modifications épigénétiques dans le contrôle de leurs propriétés.

Ma thèse a eu pour but de progresser dans l'identification des changements épigénétiques susceptibles d'accompagner la perte des propriétés des GSC en utilisant le modèle unique offert par le couple TG1 et TG1-miR-302-367. Mes travaux ont été axés sur la caractérisation des méthylations des histones. Ainsi que je l'ai décrit dans l'introduction générale de ce mémoire (page 54), les modifications post-traductionnelles des histones (méthylation, acétylations) constituent un « code » associé selon les cas à une transcription active des gènes ou au contraire à leur répression. Parmi les différentes marques épigénétiques connues des histones, nous avons axé notre étude sur deux marques de l'histone 3 (H3) correspondant à la triméthylation de la lysine 4 (H3K4me3), et à la triméthylation de la lysine 27 (H3K27me3). Ce choix a été motivé par les nombreux résultats obtenus sur des cellules souches embryonnaires (ESC) murines ou humaines, qui montrent une association préférentielle de H3K4me3 à une transcription active et de H3K27me3 à une répression de la transcription (Mikkelsen et al.,

2007 ; Zhao et al., 2007 ; Pan et al., 2007). L'analyse par ChIP-Seq (Immunoprécipitation de la chromatine-séquençage) des gènes associés à chacune de ces marques dans les deux types cellulaires associée à la caractérisation des transcriptomes par Exon-arrays (puces à ADN) nous a permis d'identifier de façon détaillée des réseaux de gènes impliqués dans le maintien ou la perte des propriétés souches et tumorigènes.

B. Résultats expérimentaux

1. Approche expérimentale et résultats généraux

L'identification des gènes associés aux marques d'histone permissives ou répressives de la transcription (respectivement H3K4 et H3K27) a été menée à l'aide de la méthode ChIP-seq combinant immunoprécipitation de la chromatine et séquençage à grande échelle à partir des ADN extraits des cultures de GSC « TG1 » exprimant ou non le groupe de micro-ARN miR-302-367. Afin de renforcer l'efficacité et la précision de notre analyse, nous avons réalisé en parallèle une analyse transcriptomique sur des puces Affymetrix Exon1.0S. Notre approche expérimentale est schématisée dans la **Figure 1**.

Le séquençage des immunoprécipités de chromatine a abouti à l'analyse d'une moyenne de 150 millions de séquences pour chaque type cellulaire (mapped reads, **Figure 1**). L'alignement de ces séquences sur le génome de référence humain hg19 montre que les séquences analysées couvrent plus de 75% du génome humain (Genome coverage, **Figure 1**). Nous avons pu ainsi identifier 18264 à 18523 gènes associés aux marques d'histone H3K4 et/ou H3K27 dans les GSC et les GSC-miR-302-367. Ce taux de couverture est similaire à celui obtenu lors d'analyses de cellules non cancéreuses au génome intact (L. Journot, communication personnelle). L'analyse transcriptomique a quant-à-elle abouti à l'identification des taux de transcrits de 16723 gènes détecté dans GSC comme dans GSC-miR correspondant à une couverture de 72% du génome. 14200 gènes ont été identifiés à la fois dans les ChIP-seq et dans les transcriptomes.

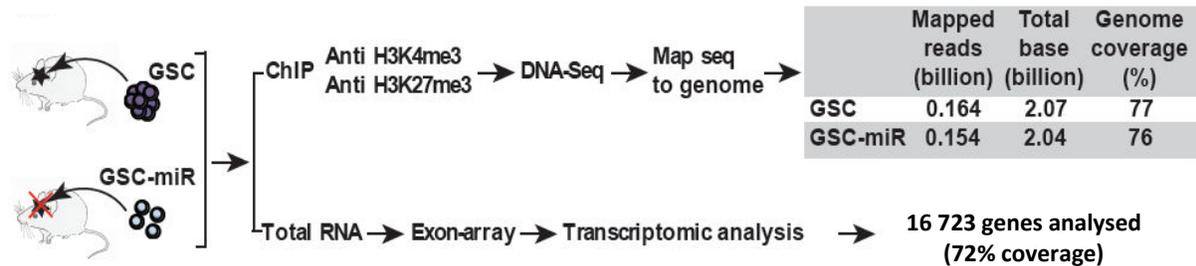


Figure 1 : Schéma récapitulatif de l'étude menée sur les changements épigénétiques des marques H3K4me3 et H3K37me3 accompagnant la perte des propriétés souches et tumorigènes. L'analyse de ces changements a été effectuée à l'aide du ChIP-Seq et d'une analyse transcriptomique.

2. Profil épigénétique des marques histones H3K4me3 et H3K27me3 dans les GSC et les GSC-miR-302-367

La présence des marques H3K4me3 et H3K27me3 a été d'abord recherchée sur une fenêtre de +/- 20kb en fonction des coordonnées du début et de fin des transcrits. Cette analyse désignée par le nom de « ChIP-Seq 20 kb », révèle une prédominance des gènes associés à la marque active H3K4me3 dans les GSC et dans les GSC-miR-302-367 (**Figure 2**). Seuls 2000 à 2500 gènes sont associés avec une marque répressive (H3K27me3) ou bivalente (H3K4me3 et H3K27me3). Le nombre de gènes ne portant aucune des deux marques H3K4me3 et H3K27me3 (désignés sous l'appellation de « none ») a été estimé sur la base du nombre de gènes référencés dans RefSeq ([NCBI Reference Sequence Database](#)) (23250 gènes au total). Cette répartition quantitative des marques H3K4 et H3K27 dans les cellules cancéreuses GSC et GSC-miR-302-367 est similaire à celle rapportée dans des cellules normales humaines (*Zhao et al., 2007 ; Akkers et al., 2009*).

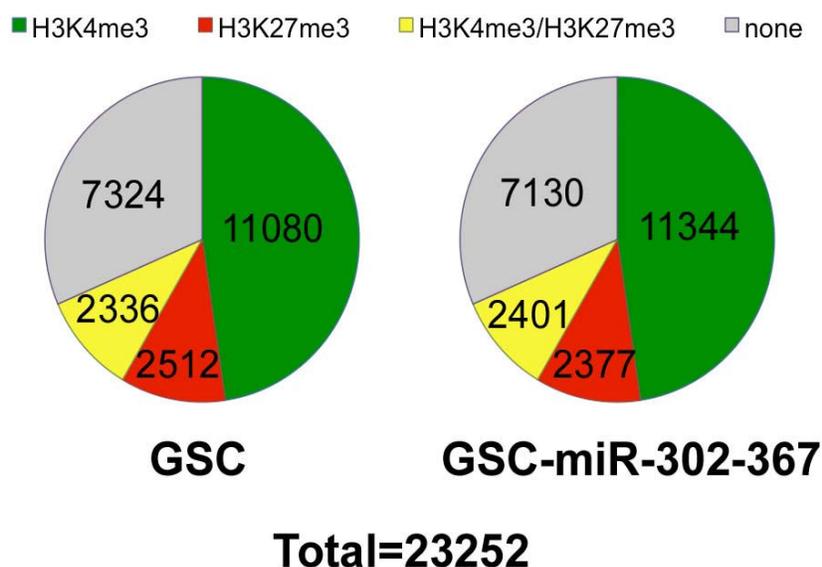


Figure 2 : Nombre de gènes identifiés portant les marques H3K4me3 et/ou H3K27me3 par ChiP-seq dans les GSC et les GSC-miR-302-367. En vert, les gènes portant la marque activatrice H3K4me3, en rouge la marque répressive H3K27me3, en jaune la marque bivalente portant à la fois la marque H3K4me3 et la marque H3K27me3 et en gris les gènes ne portant aucune de ces deux marques, ce dernier groupe est nommé « None ».

Une seconde analyse a été menée en annotant uniquement les gènes dont les marques se situent au maximum à 2kb autour du TSS (Transcription Start Site ou TSS). De cette façon, nous pouvons voir la distribution des marques H3K4me3 (K4) et H3K27me3 (K27) par rapport au TSS. Comme d'autres études ont pu le montrer, nos résultats montrent que la marque H3K4me3 a une distribution qui s'élève au niveau du TSS tandis que la distribution de la marque H3K27me3, bien qu'également concentrée au niveau du TSS, est étalée le long du gène (**Figure 3**).

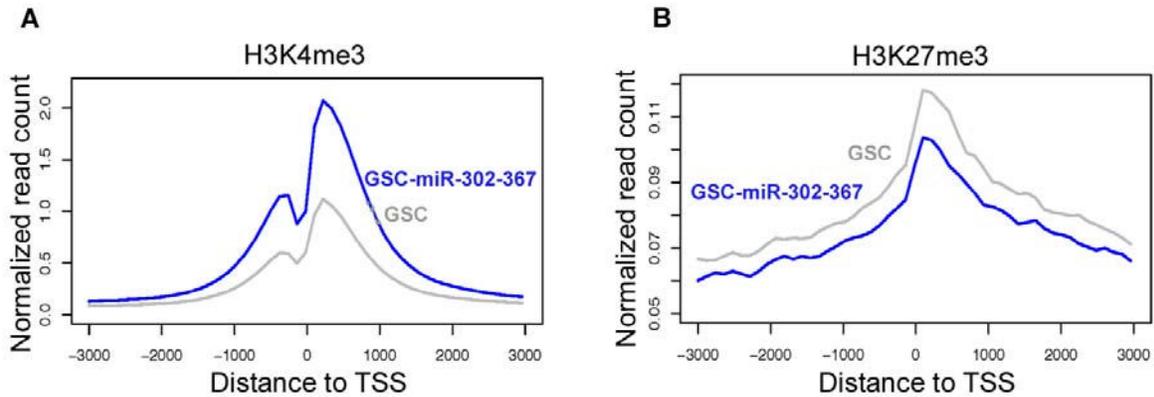


Figure 3 : Distribution moyenne des marques H3K4me3 et H3K27me3 autour du TSS dans les GSC et les GSC-miR-302-367. (A) Moyenne du profil de distribution d'H3K4me3 établi à partir de l'ensemble des gènes associés à la marque H3K4me3. (B) Moyenne du profil de distribution d'H3K27me3 établi à partir de l'ensemble des gènes associés à la marque H3K27me3. L'axe des ordonnées correspond au nombre de séquences identifiées par mégabase par million de séquences mappées. La courbe grise correspond aux GSC et la bleu aux GSC-miR-302-367.

Cette nouvelle analyse du ChIP-seq dite « ChIP-Seq 2kb » montre comme la première analyse, que les nombres de gène portant la marque H3K4me3, la marque H3K27me3 ou les deux marques sont globalement similaires dans les GSC et les GSC-miR-302-367 (13000, 1000 et 500 gènes environ, respectivement) (**Figure 4**). Il y a toutefois moins de gènes annotés dans cette analyse que dans l'analyse ChIP-Seq 20kb car cette analyse est plus restrictive et élimine des gènes dont la marque, notamment la marque H3K27me3, est située à plus de 2kb du TSS.

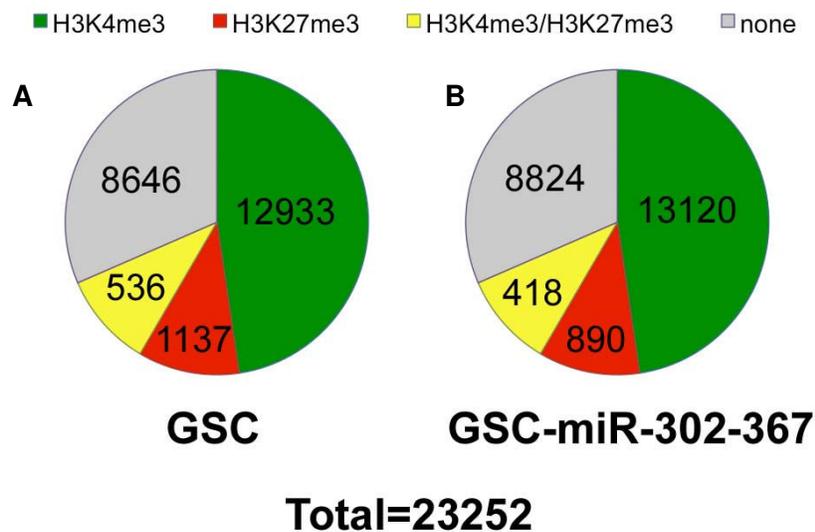


Figure 4 : Nombres de gènes identifiés portant les marques H3K4me3 et/ou H3K27me3 au niveau de leur site de début de transcription dans les GSC et les GSC-miR-302-367. Le classement des gènes a été effectué selon la présence ou non de l'enrichissement des marques H3K4me3 et H3K27me3 aux alentours du TSS (2kb). En vert, les gènes portant la marque activatrice H3K4me3, en rouge la marque répressive H3K27me3, en jaune la marque bivalente (à la fois H3K4me3 et H3K27me3) et en gris les gènes ne portant aucune de ces deux marques.

L'absence de différence marquée entre le nombre de gènes porteur de chaque marque dans les GSC-miR-302-367 et les GSC, associée à la détection par Western blot de taux similaires des formes K4me3 comme K27me3 dans les deux types cellulaires (**Figure 3**) montre que l'expression du groupe de miR-302-367 ne modifie pas de façon globale le taux de méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 ou 27 (**Figure 5**).

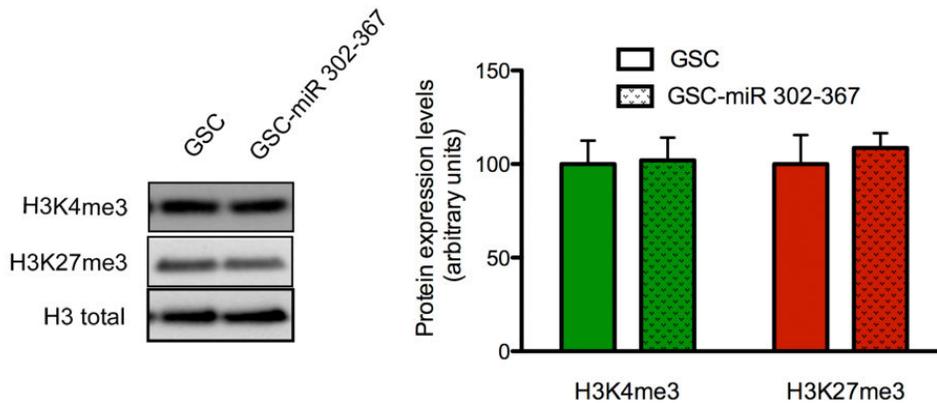


Figure 5 : L'expression de miR-302-367 ne modifie pas les quantités globales d'histone H3 ayant subi une tri-méthylation de leur lysine 4 ou 27. Panneau de gauche : exemple de détection par Western blot de l'histone H3 (H3) et de ses formes K4me3 et K27me3. Panneau de droite : analyse densitométrique des taux d'expression des formes H3K4me3 et H3K27me3 normalisés avec les taux d'expression d'H3. H3 a été détecté à l'aide d'un anticorps reconnaissant H3 quel que soit les modifications d'acétylation ou de méthylation qu'il porte. Moyenne \pm SD, n=3.

3. Profil transcriptomique comparatif des GSC et des GSC-miR-302-367

Les profils d'expression génique, ou transcriptomes, des GSC et des GSC-miR-302-367 ont été obtenus à partir de trois cultures indépendantes de chaque type cellulaire. L'analyse du regroupement hiérarchisé sans a priori des taux de transcrits des 16723 gènes identifiés montre l'existence de deux patrons différents d'expression génique dans les GSC et les GSC-miR-302-367 ; le patron d'expression d'une culture de GSC est plus proche des patrons des deux autres cultures de GSC que de celui des GSC-miR-302-367 et inversement (**Figure 6A**). Néanmoins l'analyse statistique des données montre que seuls 2134 gènes (13% des transcrits) présentent un taux différentiel d'expression entre les GSC et les GSC-miR-302-367 $\geq 1,5$ (en log2) et statistiquement significatif (pvalue $\leq 0,05$) (**Figure 6B et C, Figure supplémentaire 1**). Ces résultats suggèrent que la répression exercée par miR-302-367 sur les propriétés des GSC s'accompagne de changements d'expression génique limités en dépit de la modification drastique de phénotype subie par les cellules.

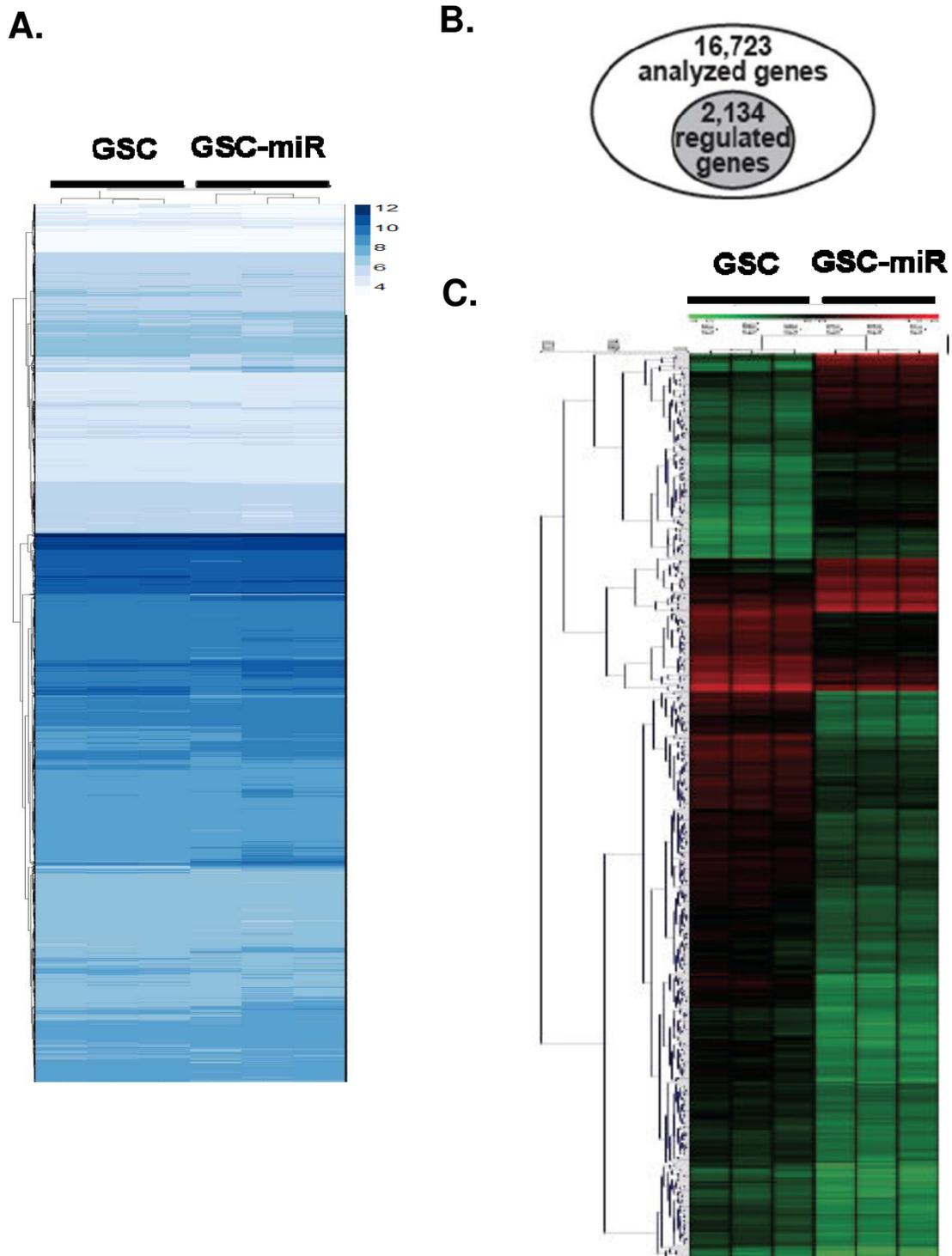


Figure 6: Profils d'expression distincts des patrons d'expression génique des GSC et des GSC-miR-302-367. A. Analyse de regroupement hiérarchisé sans a priori des données du transcriptome regroupant les gènes en fonction du niveau d'expression de leurs transcrits.

L'intensité relative des signaux d'hybridation varie de 4 à 12 et est symbolisée par l'intensité de la couleur variant du bleu clair au bleu foncé. B. Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes régulés par rapport à la totalité des gènes analysés. C. Représentation des 2134 gènes présentant une expression différentielle $\geq 1,5$ (\log_2 , $p \leq 0.05$) entre les GSC et les GSC-miR-302-367. L'intensité relative des signaux d'hybridation (4 à 12) est symbolisée par des variations de couleur allant du vert (le moins exprimé) au rouge (le plus exprimé).

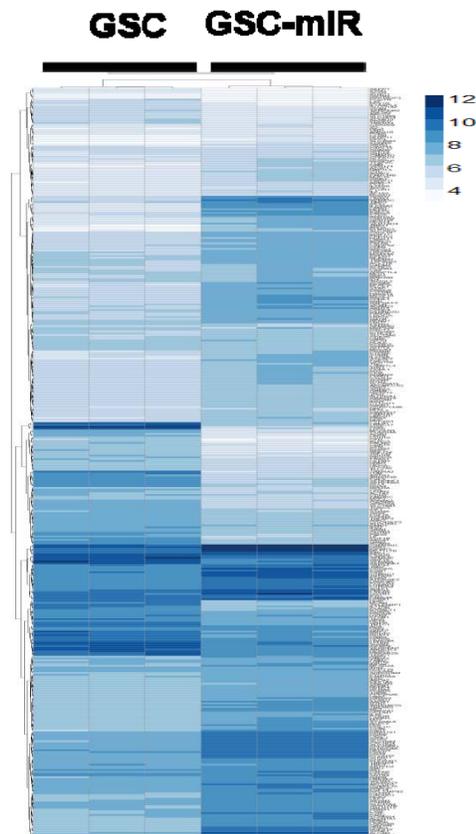


Figure Supplémentaire 1 : Heatmap des 500 transcrits les plus différentiellement régulés dans les GSC versus les GSC-miR-302-367. Les niveaux de transcrits vont de 4 à 12 et sont représentés en niveau de bleu (le plus clair étant le niveau de transcrit le plus bas (4) et le plus foncé le niveau le plus élevé (12)).

4. Corrélation positive entre les marques d'histone et les taux d'expression des gènes.

Afin de vérifier si l'association d'une marque d'histone donnée à un gène est positivement corrélée au taux de transcription de ce gène, nous avons analysé pour chaque gène le taux d'expression des transcrits déterminé par analyse transcriptomique en fonction de la marque d'histone liée au gène concerné et identifiée par l'analyse ChIP-Seq 20 kb. Les niveaux d'expression des gènes portant la marque H3K4me3, la marque H3K27me3, les deux marques H3K4me3 et H3K27me3 (bivalent) ou aucune des marques (none) constituent des groupes distincts qui diffèrent significativement de la distribution totale des valeurs du transcriptome (**Figure 7**). De plus, chaque groupe diffère des autres significativement et se positionne au niveau de transcrits attendus pour ces marques. La détermination des taux de transcrits d'un sous-groupe de gènes échangeant les marques H3K4me3 et H3K27me3 d'un type cellulaire à l'autre a été réalisée par qPCR (**Figure Supplémentaire 2**). Les variations de taux de transcrits déterminées par qPCR sont cohérents avec celles déterminées par analyse transcriptomique.

Il est à noter que les médianes des distributions des niveaux d'expression des gènes porteurs des marques d'intérêt est la même dans les GSC et les GSC-miR-302-367. Il en va de même pour les médianes de distribution des niveaux d'expression de l'ensemble des gènes identifiés (**Figure 7**) comme de celles des gènes qui ne sont pas porteurs des marques d'histone étudiées.

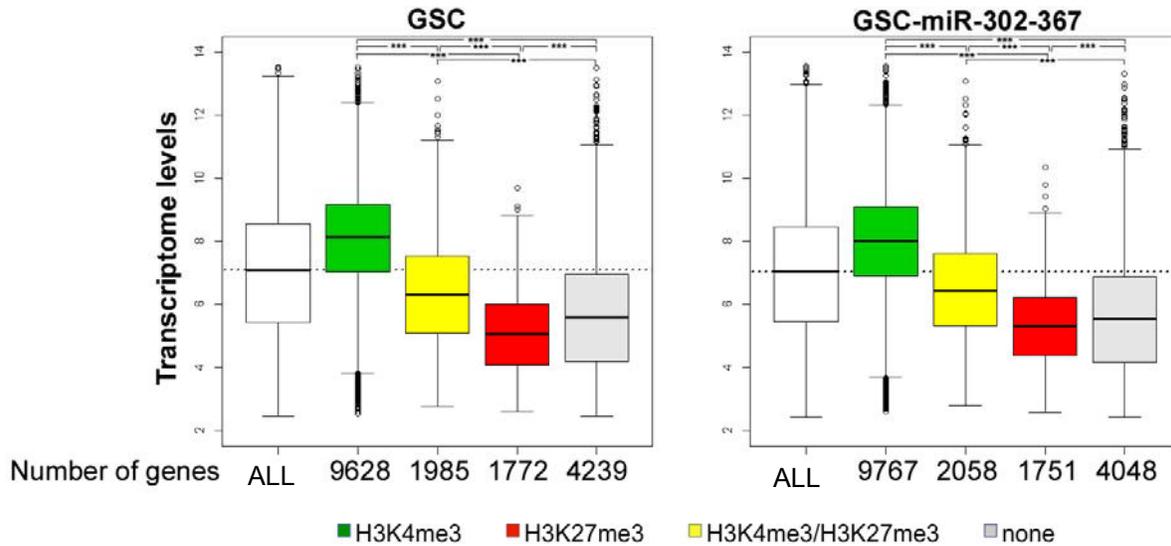


Figure 7 : Corrélation positive entre marque d’histone et niveau d’expression des gènes dans les GSC et les GSC-miR-302-367. Boîtes à moustache ou « Boxplots » montrant le niveau d’expression des transcrits des gènes (en ordonnée, données obtenues par analyse transcriptomique), en fonction de la marque d’histone associée (en abscisse, données issues de l’analyse ChIP-Seq). Les boîtes blanches représentent la distribution des niveaux d’expression de tous les gènes analysés indépendamment de leur association ou non à une marque d’histone spécifique (ALL), les boîtes vertes celles des gènes associés à la marque activatrice H3K4me3, les boîtes jaunes celles des gènes associés à la fois à la H3K4me3 et H3K27me3 (marque bivalente) et les boîtes rouges celles associées à la marque répressive H3K27. Les boîtes grises représentent la distribution des niveaux d’expression des gènes qui n’ont pas été associés à une marque. Le trait en pointillé représente la médiane de la distribution des niveaux d’expression de tous les gènes analysés (ALL). Pour chaque boîte, la médiane de distribution est indiquée par un trait noir épais. La hauteur de la boîte représente l’écart interquartile, entre le 1^{er} quartile (25%) et le 3^{ème} quartile (75%). Les moustaches s’étendent jusqu’à la valeur d’au maximum 1,5 fois l’écart interquartile. Les cercles indiquent les points situés aux extrémités de la distribution. La différence entre la distribution des niveaux d’expression de tous les gènes analysés indépendamment de leur association ou non à une marque d’histone spécifique (ALL), et chacune des autres distributions est statistiquement significative ($p < 0,05$, one-way ANOVA). *** : $p < 0.001$.

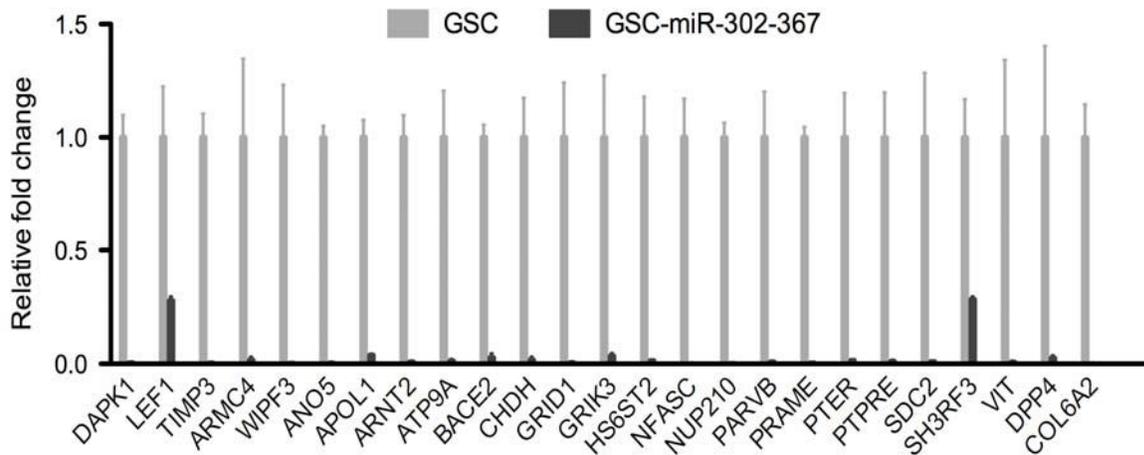
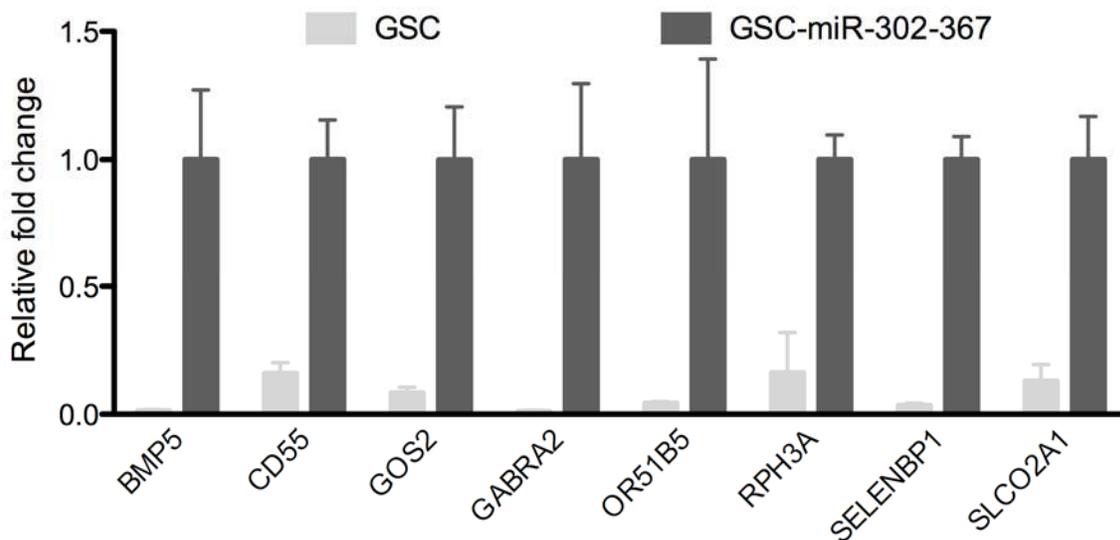
A.**B.**

Figure Supplémentaire 2 : Détermination par qPCR des niveaux d'expression d'un sous-groupe de gènes. Les gènes sélectionnés présentent une variation de taux d'expression d'un facteur ≥ 2 (\log_2) dans les analyses transcriptomiques. A. Gènes dont l'expression est diminuée dans les GSC-miR-302-367 par rapport aux GSC. B. Gènes dont l'expression est augmentée dans les GSC-miR-302-367 par rapport aux GSC. Moyenne \pm SD, $n=3$, *** $p<0.001$ non indiqué sur la figure.

Les gènes associés à la marque H3K4me3 – présumée permissive pour la transcription - sont ceux dont le niveau de transcrits est le plus élevé, et dont la médiane de distribution est située au-dessus de la médiane de distribution des taux de transcrits de l'ensemble des 16723 gènes analysés (7). Inversement, les gènes associés à la marque H3K27me3 – présumée répressive de la transcription - sont ceux avec le niveau de transcrits le plus bas, et dont la médiane de distribution est inférieure à celle des taux de transcrits de l'ensemble des gènes. Les gènes associés à la fois à H3K4me3 et H3K27me3 (marque bivalente) ont un niveau d'expression intermédiaire. La distribution des niveaux d'expression des gènes qui n'ont été associée à aucune des marques étudiée se situe à un niveau intermédiaire entre les gènes porteurs de marques bivalentes et ceux porteurs de la marque H3K27me3. Ces gènes ont donc une tendance à être réprimés plutôt qu'activés.

Dans les GSC et les GSC-miR-302-367, la marque H3K4me3 est donc préférentiellement associée à une transcription active des gènes et la marque H3K27me3 à une répression de la transcription. La co-existence des deux marques est associée à un niveau de transcription intermédiaire similaire à celui identifié dans les cellules souches embryonnaires (ESC) pour les gènes dits « en attente de mobilisation » (poised), prêts à être pleinement activés ou inhibés lors de la différenciation des ESC dans un lignage cellulaire spécifique (*Bernstein et al., 2006 ; Aloia et al., 2013*).

Cette résultats confirment l'absence de réarrangement majeur des marques d'histone H3K4me3 et H3K27me3 à la suite de la perte des propriétés souches et tumorigènes induites par miR-302-367.

Les distributions du niveau d'expression génique en fonction des marques d'histone obtenues à partir de l'analyse ChIP-Seq 20kb et de l'analyse ChIP-Seq 2kb ont été comparées. La distribution relative des niveaux de transcrits selon le type de marque est la même dans les deux analyses (**Figure 8**). Par contre, si la distribution des niveaux d'expression est la même dans les deux analyses pour les gènes associés à H3K4me3, elle diffère de façon significative pour les gènes porteurs des marques H3K27me3, bivalentes ou none dans les deux types cellulaires (**Figure 8A et B**). Ces différences sont probablement dues aux localisations différentes des marques, H3K4me3 se concentrant au niveau du TSS alors qu'H3K27me3 peut se situer dans le corps du gène.

Le fait que les niveaux moyens d'expression des gènes associés à la marque répressive H3K27me3 obtenus avec l'analyse ChIP-Seq 20kb soient inférieurs à ceux obtenus avec l'analyse ChIP-Seq restreinte au TSS, suggère que l'analyse ChIP-Seq 20kb est la plus adaptée pour l'identification des gènes dont l'expression est réprimée.

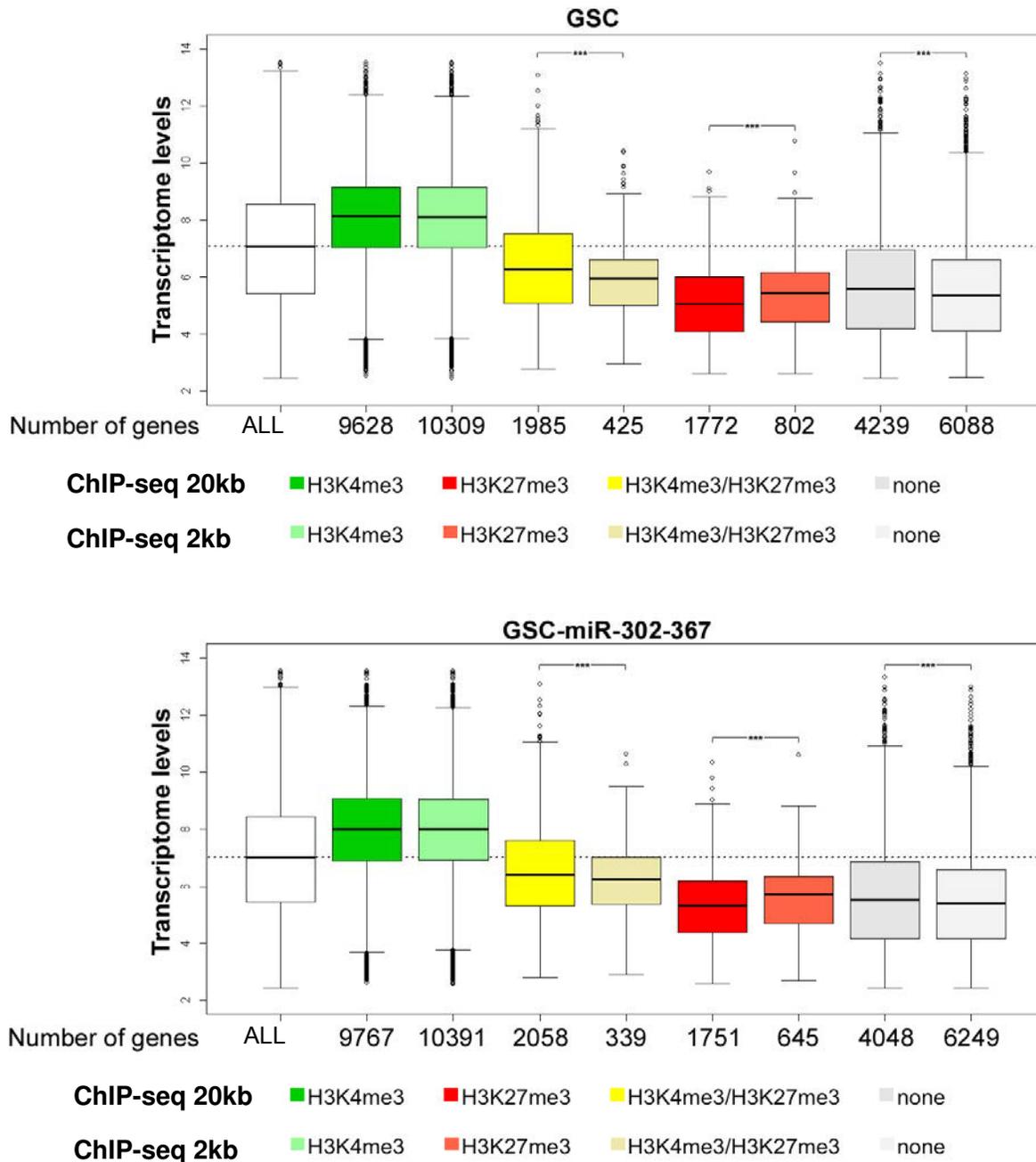


Figure 8 : Corrélation positive entre marque d'histone et niveau d'expression des gènes dans les GSC et les GSC-miR-302-367 en fonction de l'analyse ChIP-Seq 20kb et ChIP-Seq 2kb. Boîte à moustache ou Boxplot en anglais comparant le niveau de transcrits des gènes obtenus avec le transcriptome (en ordonnée), aux gènes porteurs de chaque marque ou dépourvu de marque identifiés avec l'analyse ChIP-seq 20kb ou ChIP-seq 2kb (marque activatrice H3K4me3 en vert, marque répressive H3K27me3 en rouge, marque bivalente H3K4me3 et H3K27me3 en jaune et aucune des marques en gris). La boîte blanche représente

la distribution de tous les gènes analysés dans le transcriptome (ALL). La différence entre les différentes boîtes à moustache est significative (***) $p < 0.001$) entre les deux ChIP-seq, excepté pour la marque H3K4me3.

La similarité remarquable des données que nous venons de décrire avec celles obtenues lors de la démonstration du code d'histone dans des cellules souches embryonnaires au génome normal (*Zhao et al., 2007 ; Pan et al., 2007*) montre que ce code est maintenu dans les cellules souches cancéreuses, au moins en ce qui concerne les marques H3K4me3 et H3K27me3. Cette conservation est en faveur de la pertinence de notre démarche expérimentale visant à identifier les réseaux d'expression génique associés au maintien ou à la répression des propriétés des GSC.

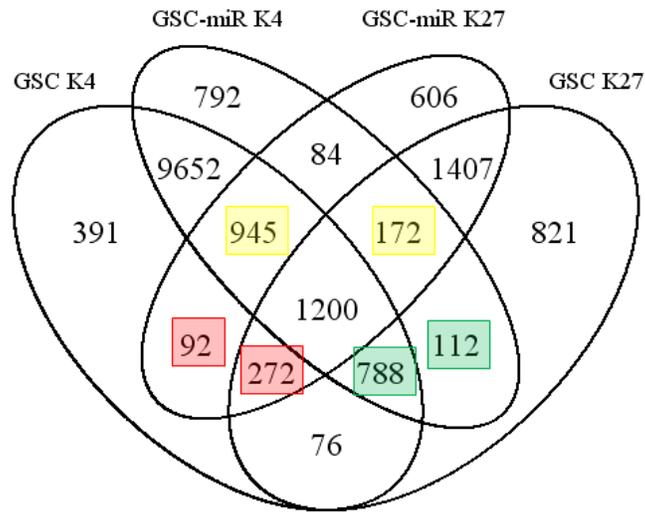
5. Changement des profils H3K4me3 et H3K27me3 accompagnant la perte des propriétés souches et tumorigènes des GSC

L'analyse détaillée des changements de marque d'histone associée à un gène donné a permis de distinguer des sous-groupes de gènes qui présentent des marques d'histone différentes dans les GSC et les GSC-miR-302-367. Ces changements concernent 30% des gènes analysés (5151/17409 gènes).

Les différentes combinaisons des gènes portant soit la marque K4, soit la marque K27, ou les deux dans les GSC et les GSC-miR-302-367 sont représentés sous forme d'un diagramme de Venn (**Figure 9**). Les variations identifiées indiquent qu'un groupe de 364 gènes ont acquis une marque inhibitrice dans les GSC-miR-302-367 alors qu'ils sont associés à une marque activatrice dans les GSC. Inversement, 900 gènes sont associés à la seule marque permissive H3K4me3 dans les GSC-miR-302-367 alors qu'ils portent une marque répressive dans les GSC.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus à partir des transcriptomes. En effet, tout comme les changements épigénétiques, les variations d'expression concernent un nombre restreint de gènes (**Figure 6**).

A.



B.

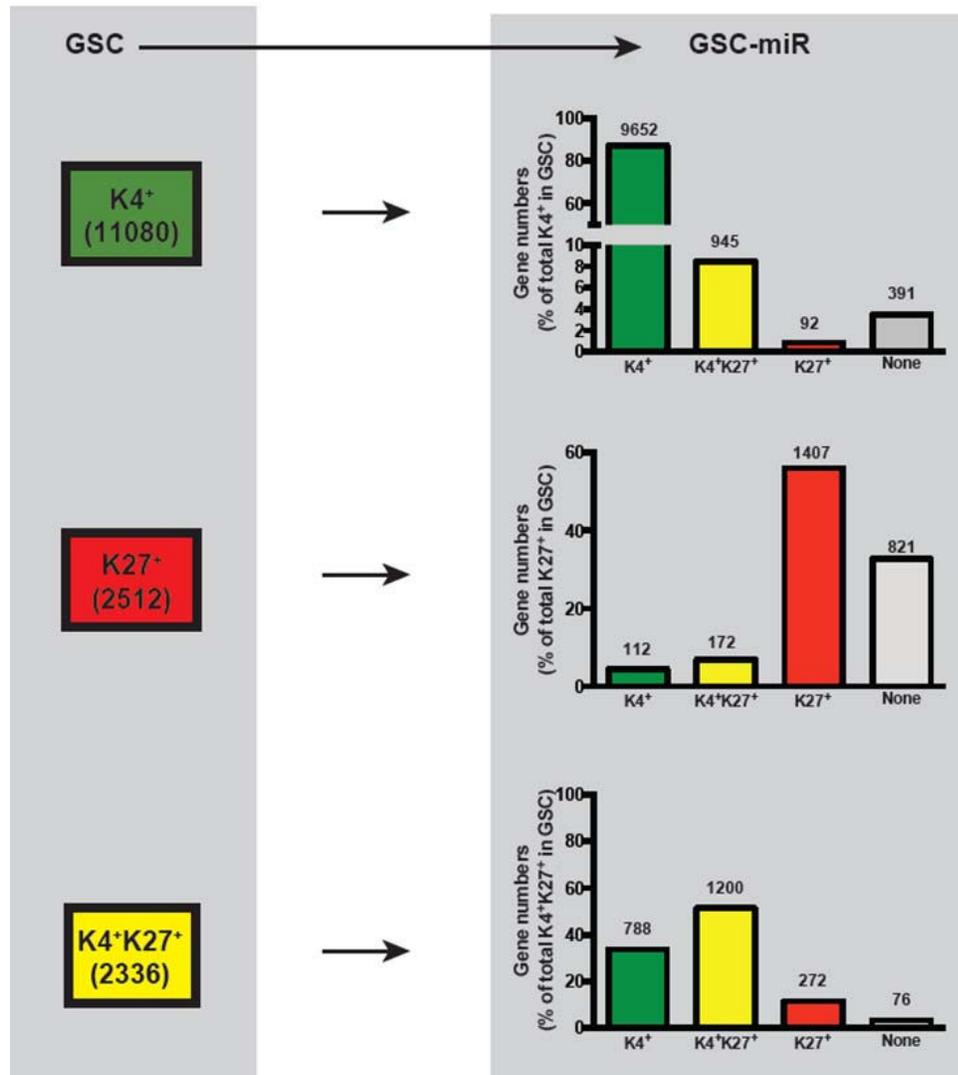


Figure 9 : A. Diagramme de Venn montrant les groupes de gènes présentant des marques d'histone différentes dans les GSC et les GSC-miR-302-367. Les chiffres représentent le nombre de gènes dans chaque catégorie. Les nombres surlignés en rouge correspondent aux groupes de gènes associés à une marque permissive pour la transcription dans les GSC (92 gènes ont une marque répressive dans les GSC-miR-302-367 alors qu'ils ont une marque activatrice dans les GSC. 272 gènes ont une marque bivalente dans les GSC et sont associés à la seule marque répressive dans les GSC-miR-302-367). Les nombres surlignés en vert correspondent aux groupes de gènes associés à une marque permissive pour la transcription dans les GSC-miR-302-367 (112 gènes ont une marque activatrice dans les GSC-miR-302-367 alors qu'ils avaient une marque répressive dans les GSC. 788 gènes ont la seule marque permissive dans les GSC-miR-302-367 alors qu'ils étaient bivalents dans les GSC). Les nombres surlignés en jaune représentent les groupes de gènes ayant acquis une marque bivalente dans les GSC-miR-302-367 alors qu'ils présentaient la seule marque permissive (945) ou répressive (172) dans les GSC. Les résultats de cette analyse distinguent des sous-groupes de gènes dont l'activation est susceptible d'être préférentiellement associée soit à l'état souche des GSC, soit aux GSC dont les propriétés souches et tumorigènes ont été réprimées. **B. Représentation schématique des modifications de marque d'histone observées dans les GSC exprimant miR-302-367.** Notez que les changements concernant les marques bivalentes correspondent majoritairement à la perte de la marque inhibitrice H3K27me3. En vert les gènes enrichis avec la marque permissive H3K4me3, en rouge les gènes enrichis avec la marque répressive H3K27me3, en jaune les gènes portant la marque bivalente (H3K4me3 et H3K27me3) et en gris les gènes dépourvus de marque H3K4me3 ou H3K27me3.

6. Analyse fonctionnelle des changements de marque d'histone

Une analyse des termes GO (« Gene ontology ») a été effectuée afin de mettre en évidence des nouveaux réseaux de gènes impliqués dans le maintien ou la sortie de l'état souche et tumorigène des GSC. Cette analyse consiste à regrouper des gènes appartenant à la même famille fonctionnelle, permettant ainsi de déterminer si la famille est surreprésentée de façon statistiquement significative par rapport à la population totale de gènes étudiés (Background). Trois analyses GO ont été réalisées à l'aide de banques de données et de logiciels informatiques différents : DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), TopGO (Topology of Gene Enrichment : Enrichment analysis for

Gene Ontology, package dans R), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) et Reactome (« database of reactions, pathways and biological processes »). Ne sont présentés ici que les résultats des analyses menées avec *DAVID*, le logiciel le plus largement utilisé dans la littérature. Dans un premier temps, nous avons effectué l'analyse sur l'ensemble des gènes (5152) présentant des marques distinctes dans les GSC et les GSC-miR-302-367 (**Figure 10**). Parmi les catégories fonctionnelles les plus significatives, on retrouve des familles de molécules associées au système nerveux central (différenciation des neurones/Neuron Differentiation) ainsi que l'on pouvait s'y attendre pour des cellules provenant de cet organe, mais aussi des familles de molécules situées au cœur du contrôle du comportement cellulaire (régulation de la mort cellulaire/Regulation of cell death, transcription, métabolisme de l'ARN/Regulation of RNA metabolism). L'identification d'une catégorie rassemblant des gènes impliqués dans la régulation de la différenciation cellulaire (positive regulation of cell differentiation) est en cohérence avec les effets inhibiteurs exercés par le groupe miR-302-367 sur les GSC. De même, les catégories associées à la motilité cellulaire (cell motion, positive regulation of cytoskeleton organization) est en cohérence avec la propension des GSC-miR-302-367 à adhérer à un support plastique permissif et avec leur perte de leurs capacités invasives (*Fareh et al., 2012*).

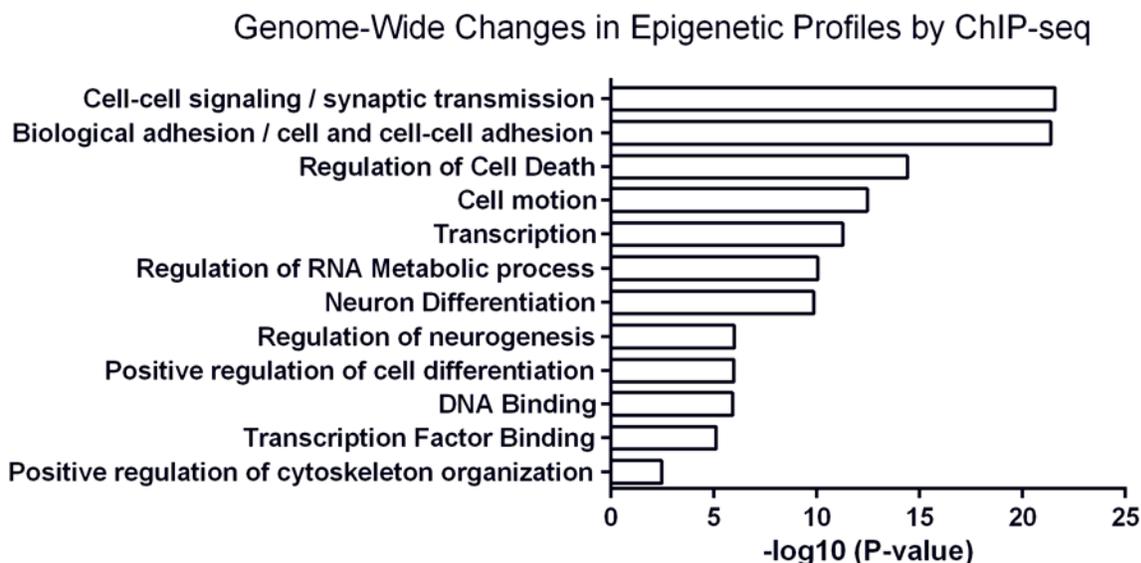
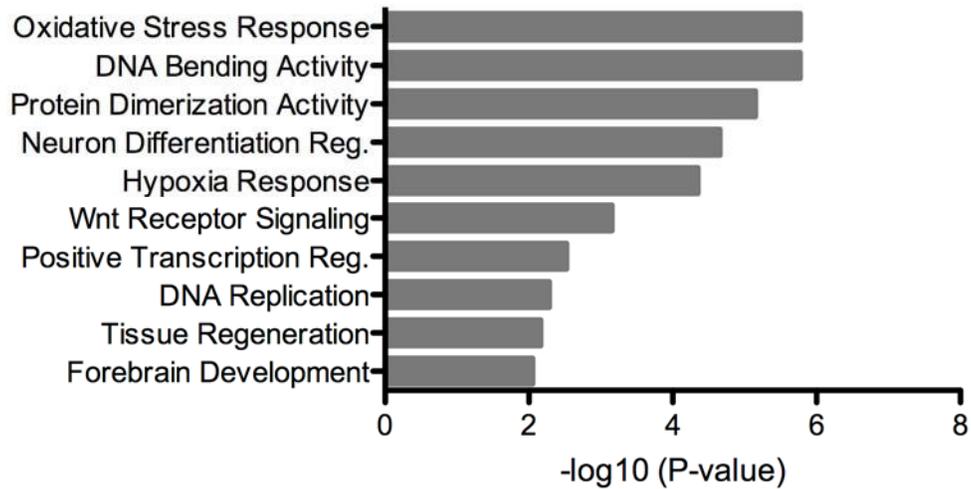


Figure 10 : Annotation fonctionnelle des changements globaux des profils de marque d'histone dans les GSC-miR-302-367 et les GSC.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'annotation fonctionnelle des groupes de gènes susceptibles de participer au maintien des propriétés des GSC à savoir ceux portant la marque répressive H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367 et la marque activatrice H3K4me3 dans les GSC (92 gènes) ou portant la marque activatrice H3K4me3 dans les GSC-miR-302-367 et la marque répressive H3K27me3 (112 gènes) (**Figure 9**). De façon intéressante, les gènes portant la marque répressive dans les GSC-miR-302-367 participent à des catégories fonctionnelles connues pour leur implication dans les propriétés souches et tumorigènes telles que la réponse à l'hypoxie (Hypoxia response) et la voie Wnt (**Figure 11A**). On retrouve de plus, à l'aide du logiciel TopGO, une catégorie « somatic stem cell maintenance » (maintien des cellules souches somatiques) et une catégorie « régulation négative de la voie canonique du récepteur Wnt » (negative regulation of canonical Wnt) parmi les gènes qui présentent une marque bivalente dans les GSC et la seule marque répressive dans les GSC-miR-302-367 (**Figure supplémentaire 3A**). L'identification d'une catégorie correspondant à la régulation de la différenciation neuronale dans le groupe de gènes échangeant une marque répressive pour une marque activatrice (Neuron Differentiation), comme dans celui échangeant une marque activatrice pour une marque répressive (Neuron Differentiation Reg.) (**Figure 11B**) est par ailleurs en cohérence avec les données de la littérature montrant que les GSC donnent naissance à des cellules tumorales dépourvues de propriétés souches et donc « différenciées » (*Piccirillo et al., 2006*). L'analyse TopGO met de plus en évidence un enrichissement des catégories liées aux voies de neurotransmission (glutamate, GABA) dans le groupe de gènes passant d'une marque répressive à une marque activatrice dans les GSC-miR-302-367 (**Figure supplémentaire 3D**). La liste des gènes composants chaque catégorie est dans le **tableau supplémentaire 1 (Annexe 3)**.

A

H3K4me3 in GSC to H3K27me3 in GSC-miR 302-367



B

H3K27me3 in GSC to H3K4me3 in GSCmiR

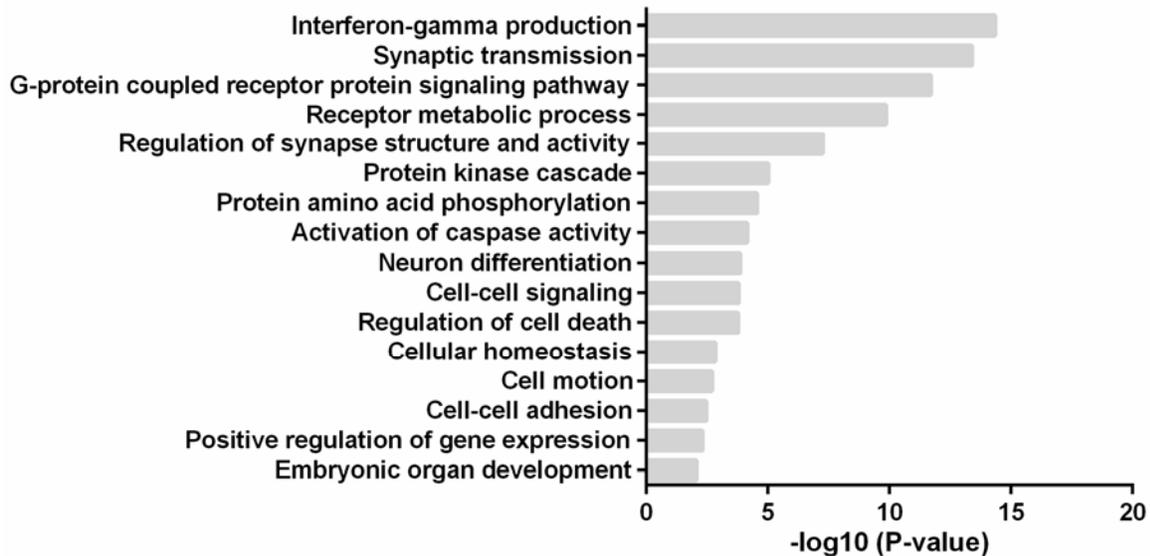


Figure 11 : Annotation fonctionnelle des gènes présentant des marques opposées dans chaque type cellulaire. (A) Gènes passant de la marque H3K4me3 dans les GSC à la marque H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367. **(B)** Gènes passant de la marque H3K27me3 dans les GSC à la marque H3K4me3 dans les GSC-miR-302-367. Annotation fonctionnelle réalisée à l'aide du programme DAVID. Reg : regulation.

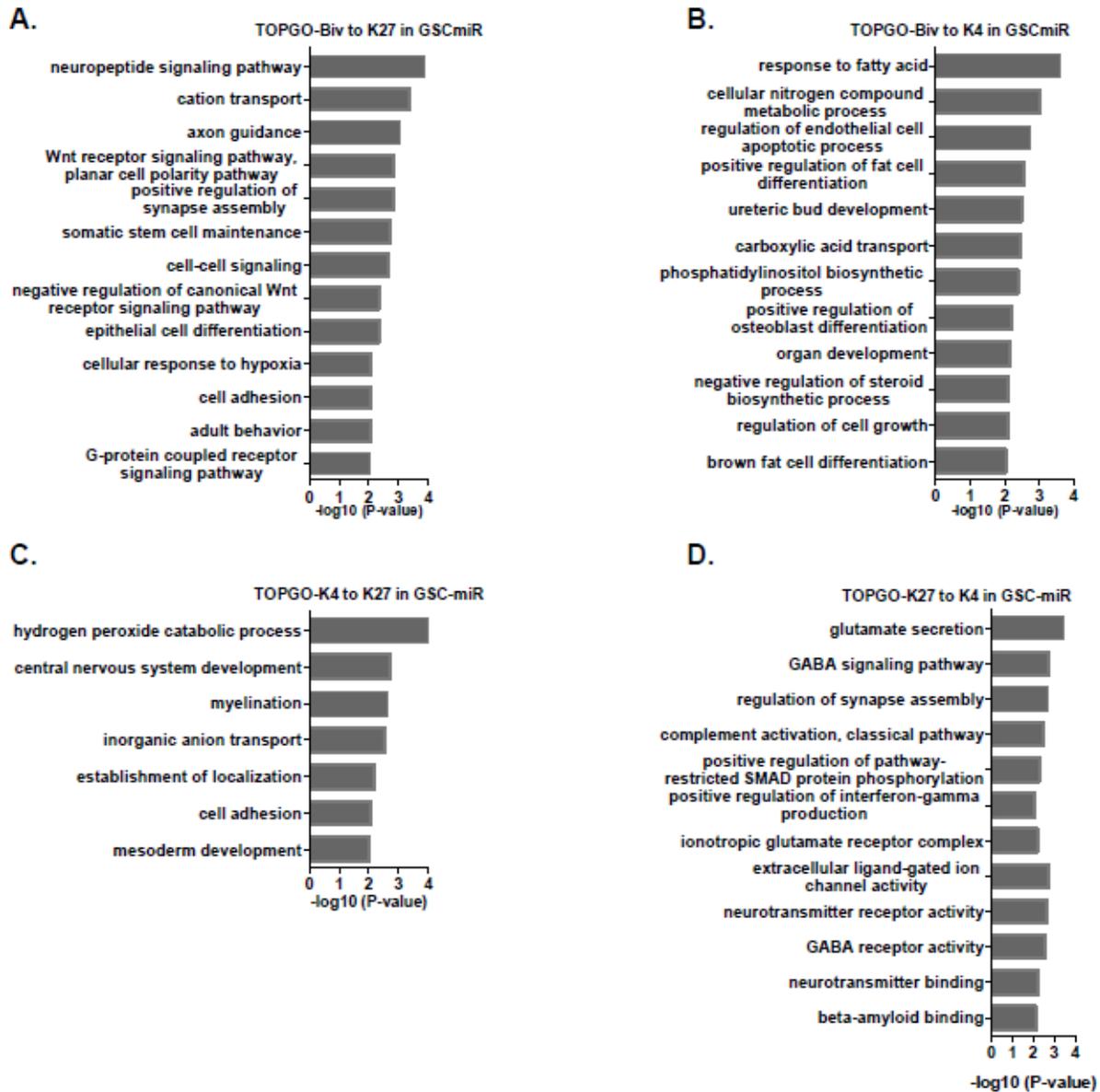


Figure Supplémentaire 3 : Annotation fonctionnelle à l'aide du programme TopGO des gènes passant de la marque bivalente dans les GSC à la marque H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367 (A), des gènes passant de la marque bivalente dans les GSC à la marque H3K4me3 dans les GSC-miR-302-367 (B), des gènes passant de la marque H3K4me3 dans les GSC à la marque H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367 (C) et des gènes passant de la marque H3K27me3 à la marque H3K4me3 dans les GSC-miR-302-367 (D).

Sur la base de ces changements de marque, nous avons cherché à identifier les réseaux transcriptionnels susceptibles de participer au contrôle des propriétés des GSC. Les gènes codant pour des facteurs transcriptionnels (82) ont été extraits de la liste des gènes changeant de marque sur la base de leur appartenance à la catégorie ontologique « Transcription Factors - Homo sapiens (human) - Eukaryotic Type » de la base de données KEGG qui rassemble 786 gènes. Les liens fonctionnels, démontrés ou inférés, susceptibles de relier les 82 facteurs transcriptionnels identifiés ont été recherchés à l'aide du programme STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins). Ce programme combine notamment les informations sur les associations protéine-protéine contenues dans les banques de données (protein-protein association information from curated knowledge databases), et l'analyse globale des données d'interaction protéine-protéine obtenues à partir de la littérature et de données à large échelle (BIND database) pour déterminer un indice de confiance d'association fonctionnelle entre deux protéines variant de 0 à 1. Nous avons retenu les liens présentant un indice de confiance élevé (high confidence score) compris entre 0.7 et 1. Ces liens ont d'abord été recherchés en considérant tous les changements de marque (**Figure 12**). Cette analyse a permis de mettre en évidence un réseau complexe de liens rassemblant notamment les facteurs de transcription associés au contrôle de la survie et du cycle cellulaire (ex : TP53, FOXO3, *Lützner et al., 2012*) mais aussi à l'agressivité tumorale (ex : HIF1A, *Semenza, 2003*) et/ou à la différenciation cellulaire (ex : FOXA2) ou aux fonctions « souches » (ex : NANOG, PPARG, LEF1, *Peymani et al., 2013 ; Higgins et al., 2013 ; Nager et al., 2012*).

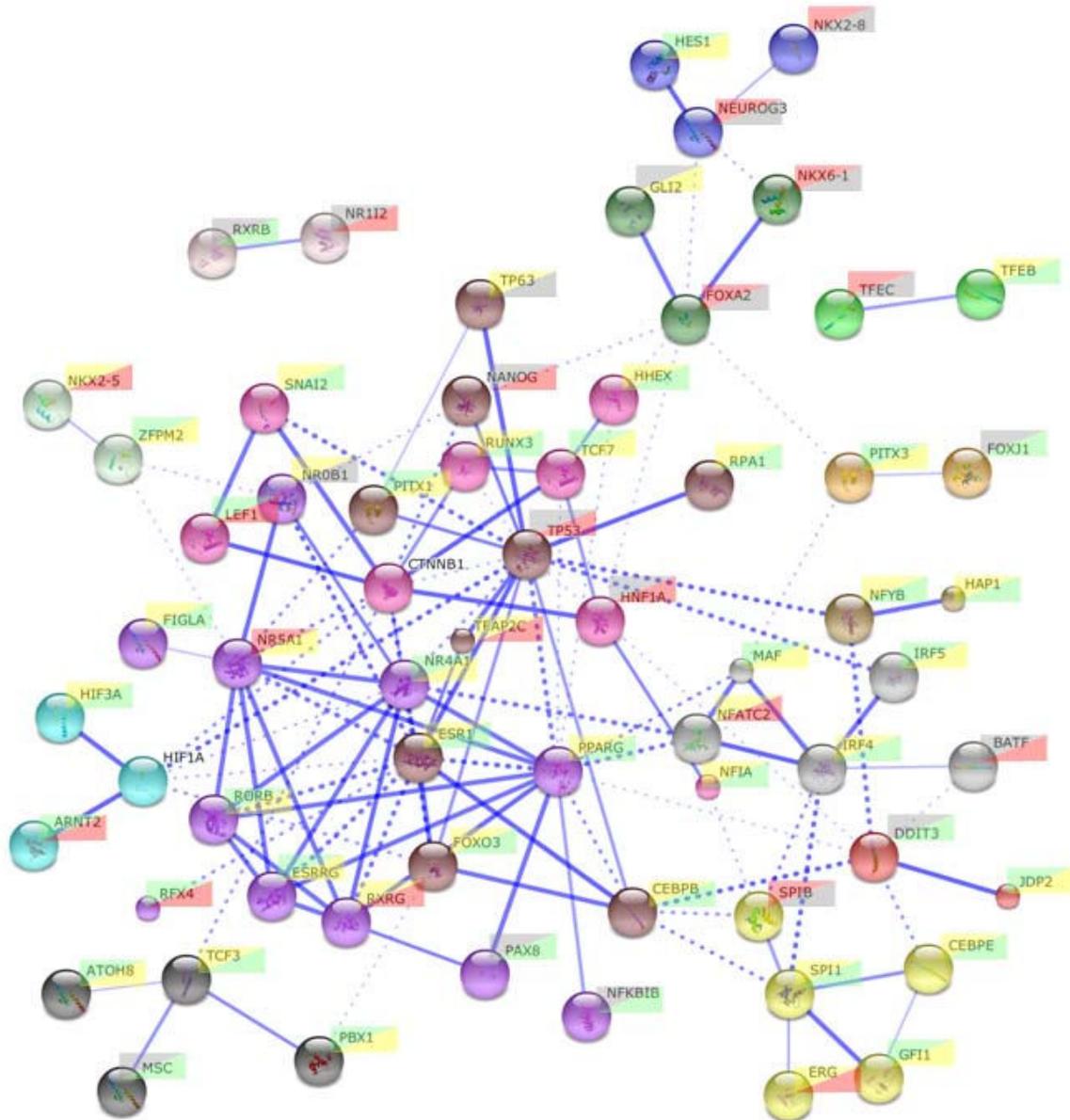


Figure 12 : Réseau reliant entre eux les facteurs de transcription présentant des marques d'histone différentes dans les GSC et les GSC-miR-302-367. Les traits entre les protéines symbolisent l'indice de confiance de la probabilité d'interaction. Les traits en pointillés représentent les liens entre des nœuds différents du réseau. Notez qu'HIF1A (HIF1 α) et CTNNB1 (β -catenin) portent les mêmes marques d'histone dans les GSC et les GSC-miR-302-367. Les noms des gènes sont surlignés en fonction des marques qu'elles portent dans les GSC (haut du rectangle) et dans les GSC-miR-302-367 (bas du rectangle). Vert : H3K4me3. Rouge : H3K27me3. Jaune : bivalent. Gris : none.

Afin de circonscrire les facteurs susceptibles de participer à la gouvernance des propriétés souches des GSC, nous avons répété l'analyse en restreignant la liste des facteurs de transcription et des cibles de ces facteurs à ceux et celles précédemment associés au phénotype des ESC (*Ben-Porath et al, 2008*). Cette analyse (réseaux non montré) a mis en évidence un réseau centré sur le facteur de transcription HIF1 α permettant de relier à ce réseau minimal 85 des 223 protéines analysées, dont le facteur de transcription Nanog nécessaire au maintien des propriétés souches des GSC (*Zbinden et al 2010, Fareh et al, 2012*).

Une analyse beaucoup plus stringente, qui se focalise sur les gènes ayant perdu la marque H3K4me3 qu'ils portaient dans les GSC et acquérant la marque H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367 (92 gènes), a révélé que le réseau dont HIF1 α fait parti se retrouve encore impliqué. Cependant, les marques épigénétiques ainsi que les taux de transcrits du facteur de transcription HIF1 α ne varient pas entre les deux types cellulaires. L'absence de variation d'expression d'HIF1 α suggère qu'un autre facteur, aussi essentiel qu'HIF1 α au fonctionnement du réseau, est régulé. Ce nouveau résultat jusqu'à présent non décrit dans la littérature implique ARNT2 (connu aussi comme HIF2 β), dans la régulation des propriétés souches et tumorigènes. ARNT2, l'un des facteurs de transcription connu pour interagir avec HIF1 α , appartient au groupe de 92 gènes ayant perdu la marque H3K4me3 qu'il portait dans les GSC et acquis la marque H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367. ARNT2 appartient également au groupe de gènes présentant une réduction d'un facteur ≥ 2 de leur expression dans les GSC-miR-302-367 par rapport aux GSC (déterminée par hybridation de puces ADN et confirmée par RT-qPCR, **Figure Supplémentaire 2**). La recherche des liens susceptibles d'associer ARNT2 aux autres gènes passant d'une marque activatrice dans les GSC à une marque répressive dans les GSC-miR-302-367, couplée à une réduction de leurs taux de transcrits ≥ 2 , a permis de relier ARNT2 à 4 des 25 gènes constituant ce groupe (**Figure 13**).

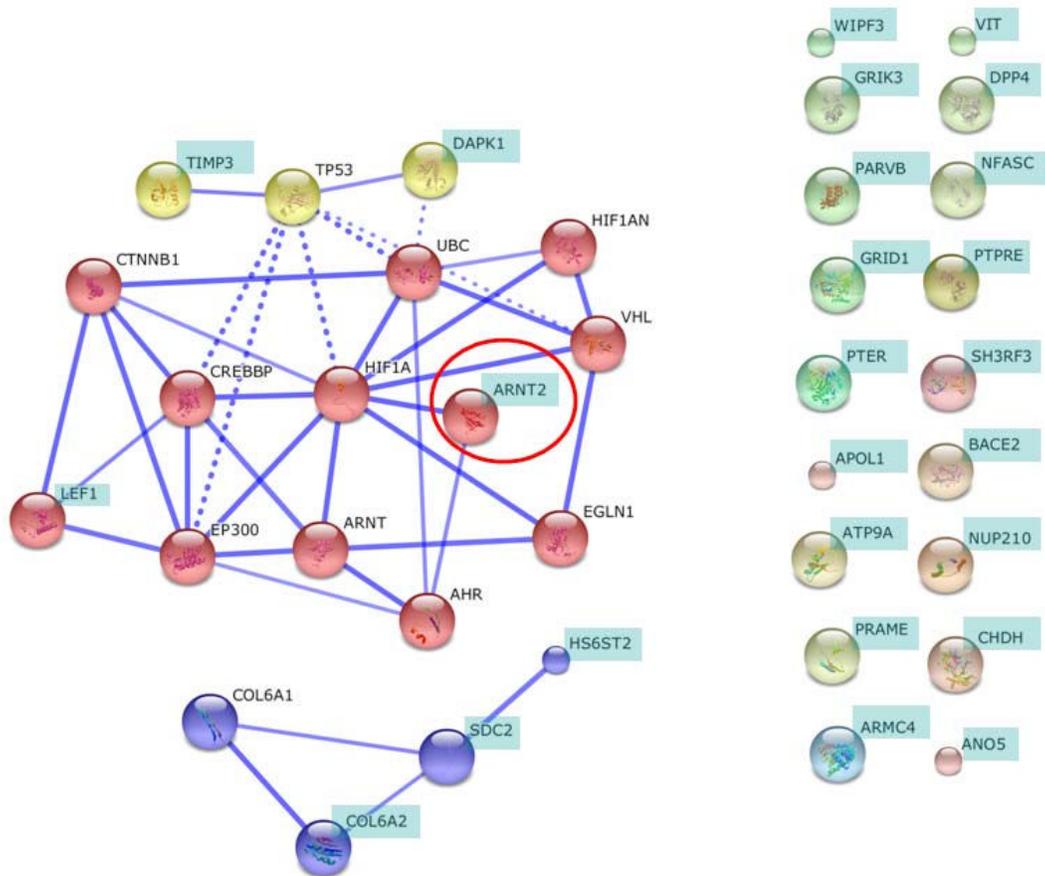


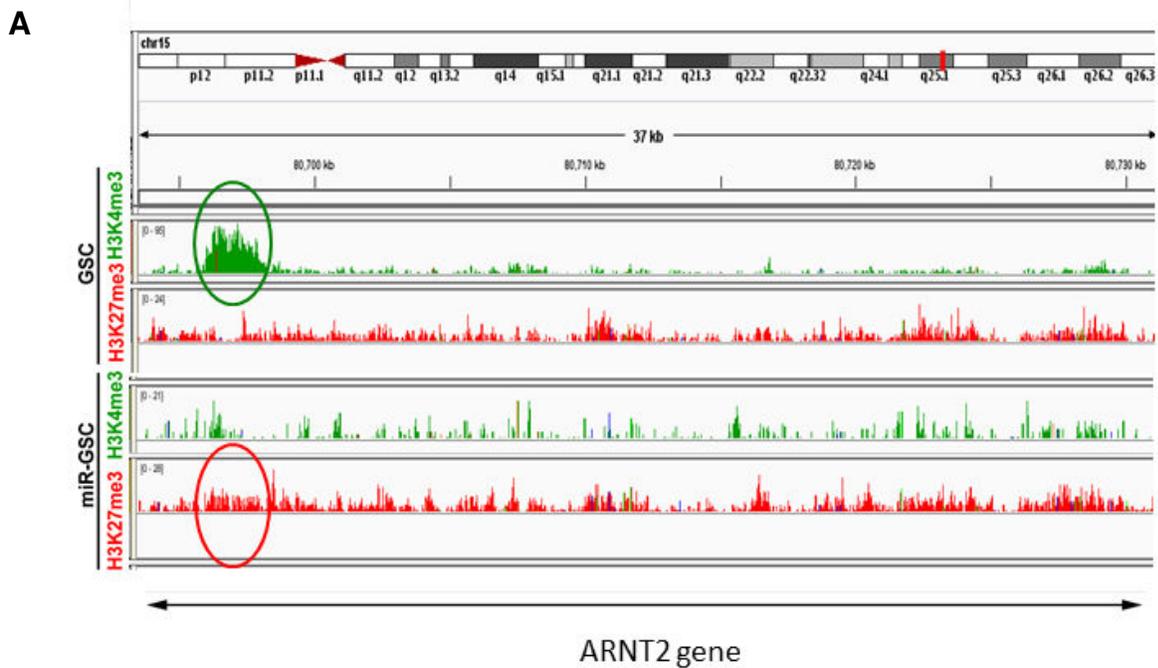
Figure 13 : Réseau de gènes associé à l'état souche et tumorigène des GSC. Les traits entre les protéines symbolisent l'indice de confiance de la probabilité d'interaction. Les traits en pointillés représentent les liens entre des nœuds différents du réseau. Les gènes dont l'expression diminue dans les GSC-miR-302-367 par rapport aux GSC et porteurs de la marque activatrice dans les GSC et de la marque répressive dans les GSC-miR-302-367 sont surlignés de bleu. Encerclé en rouge, le gène ARNT2 d'intérêt. Les gènes dont le nom n'est pas surligné ne présentent pas les mêmes changements de marques que les gènes surlignés. Les gènes présentant une variation entre les GSC et les GSC-miR-302-367 que ce soit en termes de marques d'histones ou de niveaux de transcrits mais ne formant aucun lien fonctionnel entre eux sont placés sur la droite du schéma.

ARNT2 est un facteur de transcription bHLH-PAS (basic helix loop helix with PAS domain) qui s'hétérodimérise avec plusieurs autres partenaires (HIF1 α , HIF2 α , AHR, NPAS4, SIM1-2) (*Hao et al., 2011 ; Dougherty et al., 2008*). L'expression d'ARNT2 prévaut dans le système nerveux

central tandis que celle de son homologue ARNT1 est ubiquitaire (*Drutel et al., 2000 ; Qin et al., 2011*). ARNT2 s'associe à HIF1 α mais ses fonctions éventuellement modulatrices d'HIF1 sur le contrôle du métabolisme, de la survie et de la motilité des cellules tumorales (*Harris et al., 2002 ; Pugh et al., 2003 ; Formenti et al., 2010*), ont été peu explorées et sa participation aux processus tumoraux est indéterminée. Cette constatation nous a conduit à explorer un rôle éventuel d'ARNT2 dans le contrôle des propriétés des GSC.

7. ARNT2 est essentiel à la maintenance de l'état souche des GSC

En bonne corrélation avec la marque répressive H3K27me3 observée sur le gène ARNT2 dans les cellules GSCmiR-302-367 (**Figure 14A**) nous observons une diminution du taux des ARNm ARNT2 en QPCR et des protéines par Western blotting (**Figure 14B et C**).



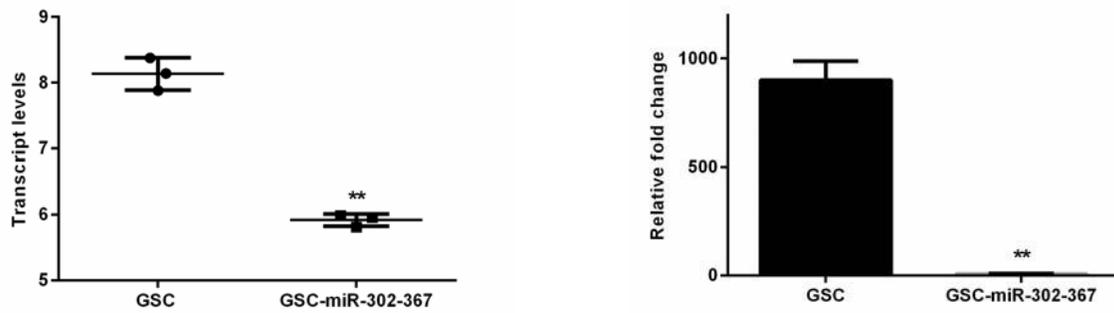
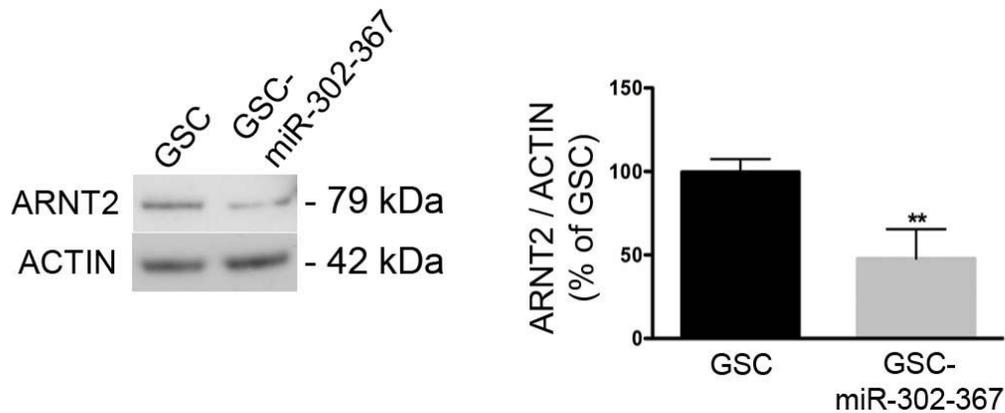
B**C**

Figure 14 : A. Association du gène ARNT2 à la marque permissive H3K4me3 dans les GSC et à la marque répressive H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367. Profil des marques H3K4me3 (en vert) et H3K27me3 (en rouge) au niveau du gène ARNT2 visualisé avec le logiciel IGV (Illumina genome viewer). ARNT2 est situé sur le chromosome 15. **B.** Taux d'ARNm d'ARNT2 déterminés par hybridation de puces d'ADN (exon-array panneau de gauche) et RT-qPCR (panneau de droite). **C.** Analyse par Western blot des taux de la protéine ARNT2. Le graphe correspond à l'analyse densitométrique. Moyenne \pm SD, n=3, **p<0.01

Afin de déterminer l'implication éventuelle d'ARNT2 dans la régulation des propriétés souches des GSC, nous avons diminué son expression en transfectant les GSC avec des siARN (small interference ARN). Les expériences ont d'abord été faites sur les cellules TG1. Puis pour vérifier le degré de généralisation des résultats, nous avons utilisé deux cultures de GSC

distinctes les GSC OB1 et TP84, respectivement isolées à partir de gliomes de haut grade de l'adulte et de l'enfant (**Tableau 3 matériels et méthodes**). La transfection des GSC avec des siARN ARNT2 aboutit à une réduction de l'expression d'ARNT2 de plus de 50% au niveau des taux d'ARNm (**Figure 15A**) et de 40 à 60 % au niveau des taux de protéines (**Figure 15B**). La diminution d'expression d'ARNT2 s'accompagne d'une diminution de la croissance des cellules, comme le montrent les comptages des cellules vivantes à l'aide de bleu Trypan (**Figure 15C**). Le nombre de cellules mortes est similaire dans les GSC transfectées avec des siARN contrôles ou des siARN ARNT2 (18 versus 16% du nombre total de cellules).

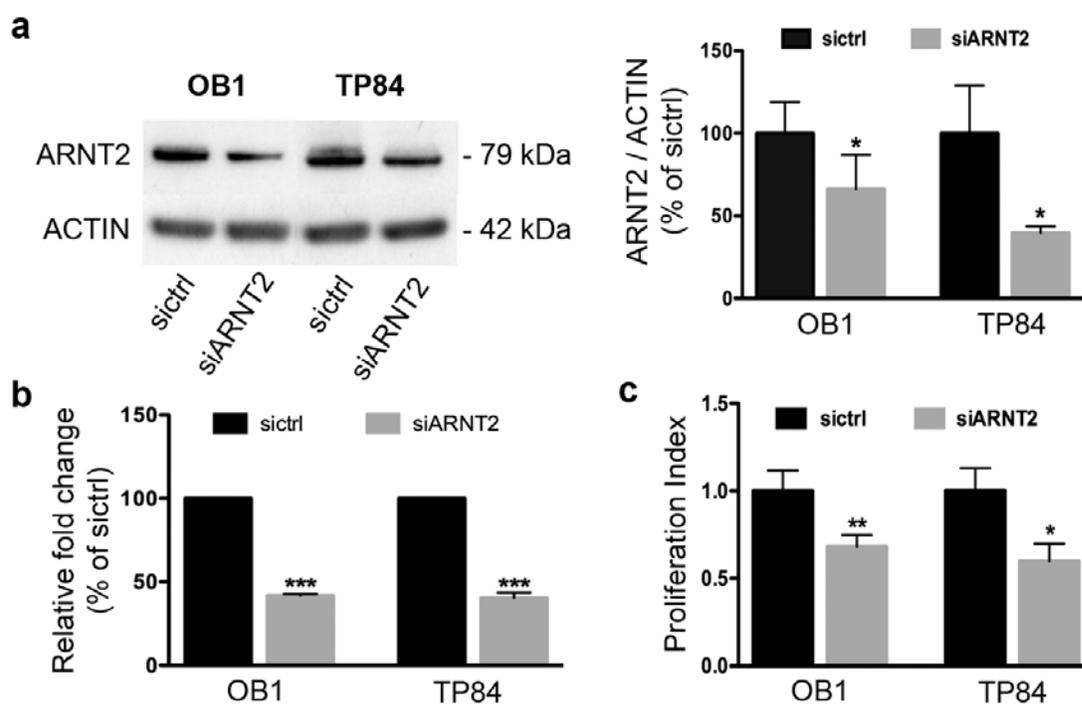


Figure 15 : A et B. Diminution de l'expression d'ARNT2 dans les GSC OB1 et TP84 transfectées avec des siARN anti-ARNT2, A. Mesure des taux d'ARNm par RT-qPCR. Moyenne \pm SD, n=3, ***p<0.0001, t de Student. **B.** Mesure des taux de protéines par Western blot. Un exemple de Western blot est présenté, ainsi que le dosage densitométrique des taux protéiques d'ARNT2. Moyenne \pm SD, n=3, *p<0.05, t de Student. **C. La réduction d'expression d'ARNT2 inhibe la croissance des GSC.** Les nombres de cellules vivantes ont été déterminés 6 jours après la transfection en comptant les cellules ayant exclu le bleu Trypan. Moyenne \pm SD, n=3, *p<0.05, **p<0.01, t de Student. siARNT2 correspond à un mélange de 2 siRNA anti-ARNT2 (siARN A et B, 125nM chaque). Sictrl correspond à un siARN contrôle (250nM).

La diminution de l'expression d'ARNT2 affecte également l'expression du facteur de transcription Nanog qui joue un rôle central dans le maintien des propriétés souches des GSC (*Zbinden et al, 2010 ; Fareh et al, 2012*). La détection immunocytochimique de Nanog a en effet révélé une diminution marquée de l'intensité du signal immunoréactif dans le noyau des GSC transfectées avec les siARNT2 (**Figure 16**).

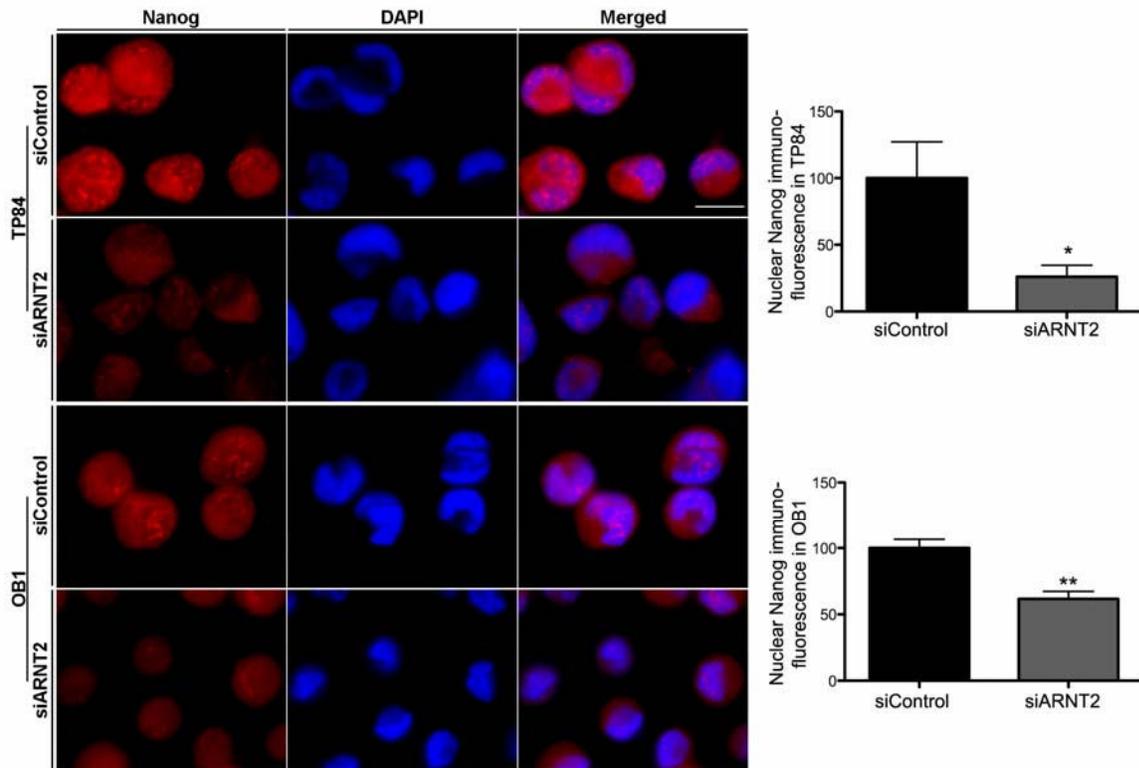


Figure 16 : La répression de l'expression d'ARNT2 inhibe l'expression du facteur de transcription Nanog. A. Marquage immunoréactif de Nanog dans les GSC TP84 et OB1 transfectées avec des siARN contrôle (siControl) et des siARN Anti-ARNT2 (siARNT2). Noter la diminution du signal immunoréactif de Nanog dans le noyau des GSC transfectées avec siARNT2. Barre d'échelle = 10 μ m. **B. et C.** Analyse quantitative des signaux immunofluorescents dans les TP84 (B) et les OB1 (C). Moyenne \pm SD, n=3. *p<0.05, **p<0.01, t de Student.

Enfin, nous avons recherché les conséquences fonctionnelles d'une diminution de l'expression d'ARNT2 à l'aide de vecteurs rapporteurs codant pour la luciférase de la luciole (Firefly) et

placés sous le contrôle de « enhancer response elements » reconnus par HIF1 α , Nanog ou Sox2. Les résultats montrent que la réduction des taux d'ARNT2 s'accompagne d'une diminution de l'activité des gènes rapporteurs HIF1 α et Nanog (**Figure 17A et B**). Elle est par contre sans effet sur l'activité du gène rapporteur Sox2 (**Figure 17C**). Ces résultats sont cohérents avec le rôle de co-facteur transcriptionnel joué par ARNT2 vis-à-vis d'HIF1a. Ils sont également en cohérence avec la diminution de l'expression de Nanog observée dans les GSC transfectées avec des siARNT2. L'absence de variation de signal observé avec le gène rapporteur Sox2 était attendue en raison de l'absence de variation dans les marques associées à SOX2 et dans les taux d'ARN messager de ce gène dans les GSC et les GSC-miR-302-367.

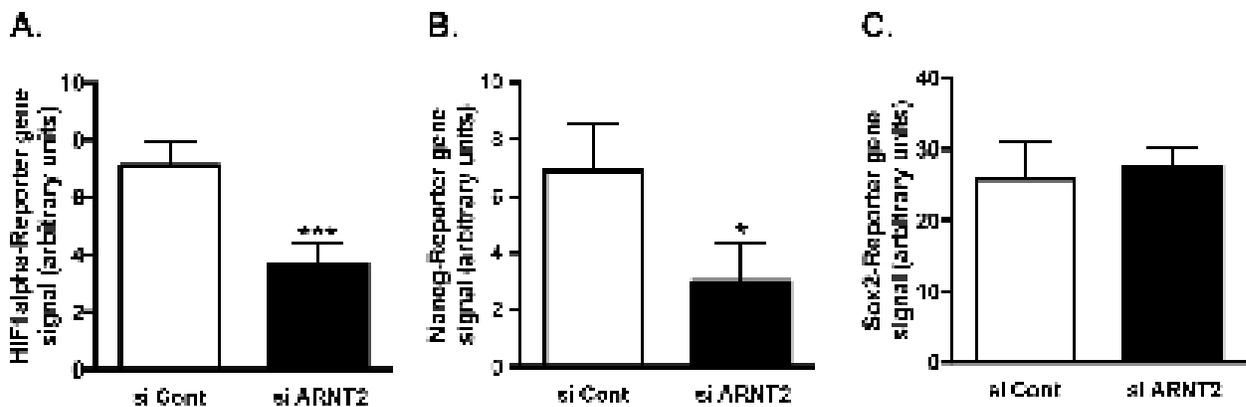


Figure 17 : La répression de l'expression d'ARNT2 induit une diminution de l'activité des gènes rapporteurs HIF1a (A) et Nanog (B) mais est sans effet sur celle du gène rapporteur Sox2 (C). Les GSC (TP84) ont été transfectées avec des siARN contrôles (si Cont) ou dirigés contre ARNT2 (si ARNT2). Moyenne \pm SD, n=4.

Ces résultats montrent qu'ARNT2 participe au contrôle du comportement des GSC en favorisant leur prolifération et l'expression du gène de maintenance de pluripotence Nanog. Ils valident donc l'hypothèse d'une association de l'expression d'ARNT2 aux propriétés souches des GSC, une hypothèse formulée sur la base des résultats issus des analyses des changements de marque d'histone dans les GSC et les GSC-miR-302-367. L'observation d'un effet stimulateur d'ARNT2 sur la croissance cellulaire et l'expression de Nanog dans des GSC dérivées de gliomes différents, aux altérations génomiques distinctes, indique que ce facteur de transcription tient une place centrale, insoupçonnée jusqu'à présent, dans la hiérarchie des gènes qui gouvernent les propriétés des GSC.

Discussion générale

Les gliomes, qui touchent aussi bien les adultes que les enfants, sont des tumeurs primitives les plus fréquentes et les plus agressives du système nerveux central. Ils font partie actuellement des cancers dont la mortalité et la morbidité sont les plus élevées (*Ohgaki H and Kleihues P, 2007*). Hautement hétérogènes, infiltrants et diffus, les gliomes sont capables d'envahir le tissu normal environnant (*Claes A et al., 2007*). Malgré les recherches intensives menées sur la pathogenèse de ces tumeurs, les traitements actuels des gliomes ne permettent qu'un prolongement modeste de la survie des patients et aucun traitement curatif n'existe à ce jour. La durée de vie des patients atteints de glioblastomes, qui sont les gliomes de plus forte malignité, n'excède pas un an après leur diagnostic.

Mes travaux ont été axés sur l'étude de GSC issues de gliomes de haut-grade. La résistance de ces cellules aux thérapies actuelles (radio- et chimiothérapies) et leur participation au développement tumoral rend nécessaire leur prise en compte dans le développement de thérapies innovantes pour traiter le glioblastome. Le défi de la recherche actuelle est non seulement d'améliorer la caractérisation des GSC, mais aussi celles des mécanismes moléculaires intrinsèques et environnementaux gouvernant leur prolifération, leur survie, leur localisation et leur phénotype, afin d'élaborer des stratégies thérapeutiques.

1. Caractérisation et ciblage thérapeutique des GSC

Dans cette optique, j'ai contribué à caractériser les GSC issues de gliomes pédiatriques. Nos travaux ont montré pour la première fois de façon détaillée l'existence de cellules dérivées de différents types et grades tumoraux qui expriment des marqueurs spécifiques aux progéniteurs neurals, de NSC ou d'ESC et possèdent des propriétés souches telles que la croissance indépendante de l'ancrage en neurosphères et l'auto-renouvellement. Similairement aux GSC dérivées des tumeurs de l'adulte, les GSC dérivées des tumeurs pédiatriques sont tumorigènes et se révèlent également résistantes aux thérapies actuelles (irradiation, alkylants de l'ADN). La corrélation inverse observée entre leur présence et la survie des patients renforce l'hypothèse selon laquelle les GSC jouent un rôle central dans l'agressivité de la tumeur et constituent donc des cibles thérapeutiques de choix.

Afin de pouvoir mieux traiter les gliomes il est indispensable d'identifier des nouvelles thérapies qui peuvent franchir la barrière hémato-encéphalique et éradiquer de façon spécifique les GSC tout en épargnant le tissu normal. Durant mes années de thèse, j'ai participé à l'étude des effets du resvératrol, un polyphénol naturel, sur les GSC. Le resvératrol, présent dans certains fruits comme les raisins, les mûres ou les cacahuètes exerce un effet

cytostatique à faibles doses et un effet cytotoxique à fortes doses sur les GSC de l'adulte. Par contre, le resvératrol ne modifie pas la prolifération et la survie des CSN. La recherche du mécanisme responsable des effets du resvératrol sur le GSC a révélé l'implication de la protéine SIRT2 qui était présente dans les GSC mais absente dans les NSC.

Forcer les GSC à sortir de leur état souche en perdant leur tumorigénicité serait une autre solution pertinente pour mieux traiter les gliomes. Dans cet état «différencié», les GSC deviennent vulnérables aux traitements existants (*Piccirillo et al., 2006*). Cependant, pour devenir une stratégie thérapeutique pertinente, cette perte de l'état souche doit être irréversible. Or, différentes études, dont celles de l'équipe, montrent que les GSC présentent une plasticité phénotypique majeure sous l'influence de signaux environnementaux. Les résultats obtenus en utilisant le sérum, l'agent de différenciation classique des GSC, montrent de plus que les GSCs peuvent perdre mais aussi retrouver leurs propriétés souches et tumorigènes (*Fareh et al., 2012 ; Natsume et al., 2013*). Ceci nous a conduit à rechercher les mécanismes épigénétiques susceptibles de rendre compte du caractère réversible des propriétés des GSC. Parmi les différentes modifications épigénétiques connues à ce jour, l'équipe a d'abord axé son attention sur les micro-ARN (miR). Les travaux réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr T. Virolle (Inserm U898, Nice, France) ont abouti à l'identification d'un groupe de miR (miR-302-367) exprimé *de novo* par les GSC en réponse à une exposition au sérum. Son expression est suffisante non seulement pour inhiber les propriétés souches des GSC mais aussi leurs propriétés initiatrices de tumeurs ; la transduction lentivirale du groupe de miR dans les GSC bloque leur capacité à initier une tumeur après leur greffe dans le striatum de souris immunodéficientes (*Fareh et al, 2012*). L'effet suppresseur de tumeur exercé par miR-302-367 offre la possibilité d'identifier les mécanismes qui régulent le maintien ou la perte des propriétés des GSC.

Le majeur but de ma thèse était de progresser dans l'identification des changements épigénétiques susceptibles d'accompagner la perte des propriétés des GSC en utilisant le modèle unique offert par le couple de cultures de GSC TG1 et TG1-miR-302-367. Mes travaux ont été axés sur la caractérisation des méthylations des histones, en particulier la triméthylation de la lysine 4 (H3K4me3) et de la lysine 27 (H3K27me3), respectivement permissive et répressive de la transcription. Une analyse par ChIP-seq (Immunoprécipitation de la chromatine-séquençage) des gènes associés à ces marques a été associée à la caractérisation des transcriptomes des cellules par exon-array.

Le modèle TG1 et TG1-miR-302-367 est particulièrement adapté à ce type d'étude car les deux types cellulaires présentent les mêmes altérations génomiques. Les études menées à ce jour sur la caractérisation de l'état de la chromatine afin d'identifier les réseaux de gènes responsables du maintien ou de la perte de l'état souche s'appuient sur la comparaison de lignées cellulaires aux profils génomiques différents. C'est le cas de l'étude de *Rheinbay et al.* publiée en juin 2013 dans laquelle les auteurs comparent des GSC avec des cellules souches neurales (NSC) dérivées de cellules souches embryonnaires, des astrocytes normaux humaines (NHA) dérivés de cerveau fœtal, et des lignées cellulaires de glioblastome cultivées en sérum provenant de la même tumeur que les GSCs. Cette approche ne prend pas en compte les aberrations génomiques telles que les délétions et/ou les amplifications chromosomiques qui peuvent affecter plusieurs centaines de gènes trouvés dans les gliomes et absentes dans les cellules normales. Par exemple, une région qui est immunoprécipitée avec l'anticorps dirigé contre la forme triméthylée de la lysine 4 ou de la lysine 27 de l'histone H3 et séquencée à haut débit par la suite peut être présente dans les cellules normales mais délétée dans les gliomes. Ceci aboutira à une fausse estimation d'un manque d'enrichissement dans cette région qui ne correspond pas à la réalité (*Ashoor et al., 2013*). De plus, l'exposition à long terme des cellules au sérum induit des modifications génomiques de façon aléatoire (*Li A et al., 2008*) (modèle utilisé également par l'équipe dirigé par le Docteur Yutaka Kondo, *Natsume et al., 2013*). Par contre, le modèle utilisé dans notre étude nous a permis d'identifier les modifications épigénétiques liées à la perte des propriétés souches et tumorigènes dans deux lignées cellulaires portant le même profil génomique.

2. Conservation du code d'histone dans les GSC

Le séquençage des immunoprécipités de chromatine a abouti à l'analyse d'une moyenne de 150 millions de séquences pour chaque type cellulaire ce qui correspond à ce que peut délivrer un HiSeq 2000 (entre 150 et 200 millions de séquences). Plus de 75% du génome humain a été couvert par les séquences analysées (séquences alignées sur le génome humain de référence hg19), avec un total de 17409 gènes uniques analysés (marques et lignées confondues). Ce taux de couverture est similaire à celui obtenu lors d'analyses de cellules non cancéreuses au génome intact (Laurent Journot, MGX plateforme, communication personnelle). L'analyse transcriptomique a de plus abouti à une couverture de 72% du génome (16723 transcrits identifiés) proche de celle achevée avec le CHIP-seq.

La présence des marques H3K4me3 et H3K27me3 a été d'abord recherchée sur une fenêtre de +/- 20kb en fonction des coordonnées du début et de fin des transcrits RefSeq (désigné ChIP-seq 20kb, « core » plus « upstream » promoteur). Ainsi, nous pouvons avoir accès également aux séquences d'ADN dites amplificateurs ou « enhancers » en anglais. Une seconde analyse a été menée cette fois-ci en annotant les gènes dont les marques se situent au maximum à 2kb autour du TSS, afin d'avoir la distribution des marques au niveau du promoteur (désigné ChIP-seq 2kb). Les deux analyses révèlent une prédominance des gènes associés à la marque active H3K4me3 dans les GSC et dans les GSC-miR-302367 (11 000 gènes et 13000 gènes pour les analyses ChIP-seq 20kb et ChIP-seq 2kb, respectivement). Seuls 2000 à 2500 gènes (analyse ChIP-seq 20kb) et 500 à 1000 gènes (ChIP-seq 2kb) sont associés à une marque répressive (H3K27me3) ou bivalente (H3K4me3 et H3K27me3). Cette répartition quantitative des marques H3K4 et H3K27 dans les cellules cancéreuses GSC et GSC-miR-302-367 est comparable à celle rapportée dans des cellules normales humaines ou cancéreuses. Par exemple, les gènes associés à la marque H3K4 dans les ESC sont dix fois plus nombreux que ceux associés à la marque H3K27 (10 278 versus 1798 gènes, *Zhao et al., 2007*). Dans le cancer ovarien de haut grade, le rapport est similaire (11066 gènes portant H3K4me3 versus 913 portant H3K27me3, *Chapman-Rothe et al., 2012*). De même, chez l'embryon de xénope, un total de 12 281 et 3 599 gènes ont été trouvés respectivement enrichis en marques H3K4me3 et H3K27me3 (*Akkers et al., 2009*). Ces résultats suggèrent que la majorité des gènes portent la marque activatrice H3K4me3, indépendamment de l'espèce ou du statut génomique de la cellule.

La seconde analyse nous a permis de localiser les marques par rapport aux TSS (-2kb à +2kb correspondant au core promoteur). Les études sur *Saccharomyces cerevisiae* (*Liu CL et al., 2005*) et chez l'homme dans les ESC (*Pan et al., 2007*) ont révélé que la marque activatrice H3K4me3 était enrichie dans des régions très proches du TSS, tandis que la marque répressive H3K27me3, bien qu'enrichie au niveau du TSS, a une distribution beaucoup plus large. Ceci est en accord avec ce que l'on observe, à savoir une distribution de H3K4me3 qui s'élève au niveau du TSS tandis que la distribution de la marque H3K27me3, bien qu'également concentrée au niveau du TSS, est étalée le long du gène.

Des analyses précédentes, menées chez l'homme (ESC, *Pan et al., 2007*), *Saccharomyces cerevisiae* (*Santos-Rosa et al., 2002*) et le poulet (*Schneider et al., 2004*) ont montré que les marques d'histone H3K4me3 et H3K27me3 étaient prédictives du taux d'expression des gènes qui y sont associés : les gènes présentant la marque H3K4me3 ont le niveau d'expression le

plus élevé, ceux présentant la marque H3K27me3 l'expression la plus basse, tandis que les gènes portant simultanément les deux modifications ont un niveau d'expression globalement bas, généralement situé à un niveau intermédiaire entre les niveaux d'expression des gènes porteurs de l'une ou l'autre des marques. Les gènes dépourvus de marque ont quant à eux un faible niveau d'expression, similaire à celui des gènes porteurs de H3K27me3. Les corrélations que nous avons réalisées entre marque d'histone et taux de transcrits mesurés par hybridation de puces ADN ont fourni des résultats identiques. Chaque groupe diffère des autres significativement et se positionne au niveau de transcrits attendus pour ces marques. Les résultats des mesures de taux d'ARN menés par RT-qPCR sur un sous-groupe de gènes échangeant les marques H3K4me3 et H3K27me3 d'un type cellulaire à l'autre étaient cohérents avec ceux des mesures réalisées par analyse transcriptomique. Nos résultats montrent également que les médianes des distributions des niveaux d'expression des gènes porteurs des marques d'intérêt, ou ne portant aucune marque est la même dans les GSC et les GSC-miR-302-367.

La détection par Western blot des formes K4me3 et K27me3 de H3 a montré des taux similaires dans les deux types cellulaires. Ces données associées avec les résultats du ChIP-seq où on observe une absence de différence marquée entre le nombre de gènes porteur de chaque marque dans les GSC-miR-302-367 et les GSC montrent que l'expression du groupe de miR-302-367 ne modifie pas de façon globale les marques H3K4me3 et H3K27me3. Dans la mesure où miR-302-367 induit une perte des propriétés souches, donc une forme de différenciation des cellules, il est intéressant de comparer nos données à celles obtenues par l'équipe dirigée par le Docteur Sander, qui a étudié les variations en marques d'histone tout au long de la différenciation des ESC en cellules pancréatiques (Xie et al., 2013). Ces auteurs rapportent que le nombre de gènes portant les marques H3K4me3 ou H3K27me3 reste constant le long de la différenciation des ESC jusqu'au stade de l'endoderme pancréatique. Ces résultats sont donc similaires à ceux que nous avons obtenus. Dans cette étude, la différenciation des ESC en cellules endocrines fonctionnelles n'a pu être achevée qu'en greffant *in vivo* les ESC préalablement amenées *in vitro* à un stade de progéniteurs. C'est à ce dernier stade de différenciation des ESC en cellules endocrines fonctionnelles que les auteurs ont pu observer une réduction notable du nombre de gènes porteurs de marques bivalentes (H3K4me3 plus H3K27me3) (Xie et al., 2013). Nous n'avons par contre pas noté de changement significatif dans le nombre de gènes porteurs de marques bivalentes entre les GSC et les GSC-miR-302-367. Les études menées sur le code d'histone dans les ESC ont montré l'association des

marques bivalentes aux gènes dits « en attente de mobilisation » (poised), c'est-à-dire prêts à être pleinement activés ou inhibés lors de la différenciation des ESC dans un lignage cellulaire spécifique (Bernstein et al., 2006 ; Jia et al. 2012). L'absence de réduction notable du nombre de gènes bivalents dans les GSC-miR-302-367 par rapport aux GSC pourrait indiquer que les cellules exprimant miR-302-367 n'adoptent pas un phénotype de cellules pleinement différenciées. Dans ce cadre, une levée de l'inhibition exercée par le groupe de micro-RNA dans les GSC-miR-302-367 est susceptible d'aboutir à la réversion des cellules vers un phénotype souche et tumorigène. Cette expérience, qui pourrait être menée en sur-exprimant les séquences consensus reconnues par les miR, associée à une étude comparative détaillée des effets des gènes porteurs de marques bivalentes dans les GSC et les GSC-miR-302-367 sur les propriétés des cellules, permettrait de progresser dans l'évaluation de l'hypothèse selon laquelle les cellules souches cancéreuses fournissent les différents sous-types cellulaires qui constituent la tumeur en suivant un processus de différenciation similaire à celui observé au cours de la différenciation des ESC. Il est toutefois important de noter que des données obtenues sur des cellules hématopoïétiques *in vivo* indiquent que la résolution de la bivalence n'a pas seulement lieu lors de la différenciation des progéniteurs mais peut s'établir de façon progressive dans les cellules différenciées (Abraham et al., 2013).

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus en analysant la distribution des marques le long des gènes, leur corrélation avec les taux d'expression des gènes et leur répartition dans l'ensemble du génome sont remarquablement similaires à ceux obtenus lors de la démonstration du code d'histone dans des cellules souches embryonnaires au génome normal (Zhao et al., 2007 ; Pan et al., 2007). Cette similarité indique que les aberrations génomiques qui caractérisent les cellules cancéreuses ne s'accompagnent pas d'altérations du code d'histone, au moins en ce qui concerne les marques H3K4me3 et H3K27me3. Cette conservation permet donc d'utiliser ce code pour circonscrire des réseaux d'expression génique associés au maintien ou à la répression des propriétés des GSC.

3. Signification des changements de marques d'histone accompagnant la répression des propriétés des GSC par miR-302-367

Trente pour cent des gènes analysés sont associés à des marques d'histone différentes dans les GSC et les GSC-miR-302-367. La majorité des changements de marque correspond à l'acquisition d'une marque activatrice dans les GSC-miR-302-367 ; 900 gènes sont concernés contre 364 acquérant une marque répressive. L'acquisition d'un statut permissif de la

chromatine correspond en majorité par la résolution des marques bivalentes qui perdent la marque répressive H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367. Ceci indique qu'un plus grand nombre de gènes est activé pendant la perte des propriétés souches et tumorigènes.

L'analyse des catégories fonctionnelles (Gene Ontology) dans lesquelles se répartissent les gènes dont les marques d'histone diffèrent dans les GSC-miR-302-367 par rapport aux GSC, a révélé des catégories associées aux processus de différenciation. Ces catégories sont présentes aussi bien dans l'analyse prenant en compte tous les gènes quel que soit le type de modification (Figure 10), ou les analyses restreintes aux sous-groupes correspondant à un changement donné (Figure 11). Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par le groupe de BE Bernstein (*Rheinbay et al., 2013*), qui a réalisé une analyse d'annotation fonctionnelle avec le programme *DAVID* des groupes de gènes associés à une chromatine active dans des GSC de glioblastomes alors qu'ils sont associés à une chromatine répressive dans des astrocytes humains (NHA). Dans cette étude, les termes GO les plus significativement enrichis sont reliés au développement et à la régulation transcriptionnelle. Ces résultats des analyses de termes ontologiques mettent à nouveau en avant l'idée selon laquelle la perte des propriétés des GSC induite par miR-302-367 correspondrait, au moins en partie, à un engagement des GSC dans une voie de différenciation. Il est par ailleurs intéressant de noter que toutes les catégories issues des analyses que nous avons menées comprennent des catégories fonctionnelles associées au système nerveux (neuron, neurogenesis, synapse, forebrain), indiquant qu'en dépit de leurs aberrations, les GSC conservent l'empreinte de leur tissu d'origine.

Les catégories fonctionnelles identifiées comprennent aussi des familles de molécules associées au métabolisme de la cellule (Oxydative stress response, Cell homeostasis, Hypoxia response). Le métabolisme a récemment été présenté comme une « marque émergente » susceptible de rejoindre la liste des marques distinctives du cancer établies par Hanahan et Weinberg en 2000 (*Hanahan et Weinberg, 2011*. Liste initiale de 6 items: «sustaining proliferative signaling, evading growth suppressors, resisting cell death, enabling replicative immortality, inducing angiogenesis, and activating invasion and metastasis, Items émergents: « reprogramming of energy metabolism and evading immune destruction »). Les découvertes les plus récentes indiquent que la dérégulation du métabolisme des cellules cancéreuses ne se limite pas à la seule reprogrammation des voies de production de l'énergie. La découverte de mutations du gène *IDH1*, codant pour un enzyme cytosolique l'isocitrate dehydrogenase dans différents cancers dont les gliomes diffus à croissance lente (*Parsons et al., 2008 ; Yan et al.,*

2009 ; *Figuroa et al., 2010 ; Mardis et al., 2009*) a notamment révélé l'importance des liens entre métabolisme cellulaire et modifications épigénétiques. La protéine IDH1 mutée acquiert une nouvelle fonction lui permettant de catalyser la formation de 2-hydroxyglutarate (2-HG) à partir d'alpha-cétoglutarate (dénommé également 2-oxoglutarate). L'alpha-cétoglutarate est un co-facteur nécessaire à l'activité de nombreuses réactions enzymatiques, dont celles impliquées dans les modifications épigénétiques. Le 2-HG, en prenant la place de l'alpha-kétoglutarate sur son site de liaison aux enzymes altère leur activité. Il inhibe notamment l'activité enzymatique de TET2, l'enzyme assurant la première étape de la déméthylation de l'ADN au travers de l'hydroxylation des 5-méthylcytosines. Cette inhibition aboutit à une hyperméthylation des promoteurs (*Figuroa et al., 2010*). Un lien inattendu entre le métabolisme des cellules cancéreuses et l'épigénétique est donc en train d'émerger. Les gliomes qui arborent la mutation *IDH1* ne diffèrent pas seulement au niveau de leur profil génomique et épigénomique, mais aussi dans leur démographie, leur anatomie et leur phénotype et suivent une évolution clinique différente. Les résultats des travaux de notre groupe sur les réarrangements métaboliques qui prennent place dans les GSC-miR-302-367 (qui comme les GSC issues de glioblastomes primaires ne présentent de mutation *IDH1*), et auxquels j'ai participé ont abouti à la découverte de nouvelles altérations métaboliques liées à la voie de synthèse du GABA. Le traitement de GSC issues de divers types de gliomes de haut-grade avec les métabolites identifiés reproduit en partie les effets répressifs de miR-302-367 sur les propriétés des GSC et cet effet est sous-tendu par une inhibition de l'activité de TET2. Il est à noter que le gène *TET2* est associé à une marque bivalente dans les GSC-miR-302-367, et à la seule marque permissive H3K4me3 dans les GSC. Les résultats de cette étude sont en cours de rédaction. Une autre étude est par ailleurs en cours de mise en place visant à déterminer les liens de causalité éventuels entre les variations de marques que nous avons observées sur différents gènes codant pour des enzymes du métabolisme et les modifications globales du métabolisme que nous avons déterminés grâce à la caractérisation des métabolomes des deux types cellulaires.

L'analyse des catégories fonctionnelles regroupant les gènes présentant des marques bivalentes dans les GSC et une seule marque dans les GSC-miR-302-367 ou inversement, a par ailleurs révélé plusieurs gènes appartenant à la famille des polycomb. Les protéines du groupe polycomb agissent sous la forme de complexes et sont responsables de la mise en place de la marque H3K27me3 et de l'inhibition de la transcription (*Margueron et al., 2008*). Ils jouent ainsi un rôle central dans les modifications épigénétiques. De nombreux travaux ont

montré que la sur-expression dans les glioblastomes d'EZH2, un membre du complexe de protéines du groupe polycomb PRC2, est associée à un mauvais pronostic (*Suvà et al., 2009 ; Ott et al., 2012 ; Kim E et al., 2013*). Une étude récente a également montré que la diminution de l'expression d'EZH2 bloquait les effets inhibiteurs du sérum sur les propriétés des GSC (*Natsume et al., 2013*). Les résultats que nous avons obtenus au cours de notre étude de la répartition comparée des marques H3K4me3 et H3K27me3 dans les GSC et les GSC-miR-302-367 suggèrent que d'autres membres des complexes polycomb sont également impliqués dans le contrôle des propriétés souches des GSC. Ces résultats font l'objet d'une étude en cours de réalisation.

4. Un rôle insoupçonné d'ARNT2 dans le maintien des propriétés souches des GSC.

Ces changements de marque nous ont conduit à identifier un réseau de facteurs de transcription dont le niveau d'expression varie selon le gain ou la perte des propriétés des GSC. Sur les 786 facteurs de transcription existants dans la base de KEGG, 82 ont un changement au niveau des marques d'histones analysées dans les GSC-miR-302-367 en comparaison des GSC naïves. Le programme STRING nous a permis de mettre en évidence un réseau complexe formé par des facteurs de transcription associés au contrôle de la survie et du cycle cellulaire (ex : *TP53, FOXO3*, Lützner et al., 2012) mais aussi à l'agressivité tumorale (ex : *HIF1A, Semenza et al., 2003*) et/ou à la différenciation cellulaire (ex : *FOXA2*) ou aux fonctions « souches » (ex : *NANOG, PPARG, LEF1*, Peymani et al., 2013 ; Higgins et al., 2013 ; Nager et al., 2012).

L'existence d'un réseau suggéré par le programme bioinformatique doit toutefois être interprétée à la lumière de nos résultats réels. En effet, si nous prenons l'exemple de *FOXA2*, ce facteur a été montré comme étant indispensable au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires (ESC) (Li Z et al., 2012) et pour la différenciation des cellules alpha du pancréas (Lee CS et al., 2005). La down-régulation de *FOXA2* aboutit soit à une différenciation déficiente des ESC (Li Z et al., 2012), soit à une mort précoce des souris KO pour *FOXA2* (Lee CS et al., 2005). La prédiction dans notre modèle serait donc une expression accrue de *FOXA2* dans les GSC-miR-302-367. De fait nous observons dans notre cas que *FOXA2* porte la marque répressive H3K27me3 dans les GSC et aucune marque dans les GSC-miR-302-367, ce qui pourrait suggérer un gène libre pour la transcription. Tel n'est pas le cas puisqu'au niveau transcriptomique, les taux de transcrits de ce gène ne varient pas. En fait, dans les deux lignées, les taux de transcrits sont faibles aux environs de 7. La discordance apparente entre les

résultats ChIP-seq et du transcriptome sous-entend que d'autres marques épigénétiques sont impliquées. Nous pouvons poser l'hypothèse que le mécanisme de différenciation incluant la déméthylation de H3K27 de FOXA2 est actif en réponse à l'expression de miR302-367 mais que FOXA2 ne joue aucun rôle majeur dans le maintien ou la perte de l'état souche des GSC compte tenu de son très faible niveau d'expression dans ces cellules.

En ce qui concerne la voie de signalisation Wnt, son activation joue un rôle critique dans le maintien des cellules souches dans un état indifférencié, dans le développement des cancers, dont les glioblastomes, incluant la prolifération cellulaire et l'invasion (*Zheng et al., 2010; Zhang et al., 2011*). Brièvement, la liaison des protéines Wnt (wingless integration site) aux récepteurs Frizzled (Fz) et LRP (Low-Density Lipoprotein Related Protein) initie une cascade de transduction menant à la stabilisation du facteur de transcription co-activateur β -caténine qui alors se transloque dans le noyau pour former un complexe avec le facteur de transcription TCF (T cell factor) ou LEF1 (Lymphoid enhancer-binding factor 1) et enfin activer l'expression des gènes cibles de Wnt comme *c-myc* ou *cyclin D1* (*Clevers, 2006; Moon et al., 2004*). Un régulateur négatif de la voie de Wnt, DKK (Dickkopf) inhibe la dimérisation de LRP avec Fz. Notre réseau inclut LEF1, un des membres clés de la voie Wnt, qui a perdu la marque H3K4me3 qu'il portait dans les GSC et acquis la marque H3K27me3 dans les GSC-miR-302-367. En bonne corrélation, ce changement de marques est accompagné d'une diminution significative de ses taux de transcrits et d'une diminution au niveau de la protéine dans les GSC-miR-302-367 (*données non présentées*). L'étude de *Rheinbay et al.*, évoqué précédemment, a montré qu'une stimulation générale de la voie Wnt aboutissant à l'activation de LEF1 dans les GSC est essentielle pour la maintenance et la tumorigénicité *in vivo* des cellules souches de glioblastomes. De façon intéressante dans leur système ils décrivent un mécanisme d'action basé sur le facteur de transcription *ASCL1*, qui active la voie Wnt en réprimant le régulateur négatif *DKK1*. Dans notre modèle, *ASCL1* porte la marque H3K27me3 dans les GSC comme dans les GSC-miR-302-367. Cette répression au niveau de la chromatine est corrélée à un faible niveau de transcrit dans les deux lignées cellulaires. Ces résultats indiquent donc que la répression des propriétés des GSC par miR-302-367 s'accompagne d'une répression de la signalisation wnt indépendante de la mise en jeu d'*ASCL1*.

Dans l'analyse du réseau complexe obtenu, nous nous sommes focalisé sur les facteurs de transcription et de leurs cibles associés au phénotype des cellules souches embryonnaires (Ben-Porath et al, 2008) en posant comme hypothèse de travail qu'ils devaient être les principaux acteurs participant au contrôle des propriétés souches des GSC. Cette analyse a

permis de révéler un réseau de plus de 80 protéines centré autour d'HIF1 α . HIF1 α a été impliqué dans la gouvernance de multiples propriétés biologiques des cellules cancéreuses, allant de la prolifération à l'induction de l'angiogenèse (*Semenza et al., 2003*). Toutefois HIF1A lui-même ne présente pas de modification de son expression entre les GSC et les GSC-miR-302-367 : la marque H3K4me3 portée par HIF1A comme les taux de ses transcrits ne varient pas entre les GSC et les GSC-miR-302-367. Le centrage est donc probablement dû à un facteur interagissant fortement avec HIF1A et impliqué dans la maintenance des propriétés souches. Cette hypothèse nous a permis d'identifier le gène codant pour son co-facteur ARNT2 porte une marque activatrice H3K4me3 dans les GSC et une marque répressive dans les GSC-miR-302-367. La présence de la marque H3K27me3 s'accompagne de plus d'une réduction d'un facteur ≥ 5 de ses transcrits dans les GSC-miR-302-367 par rapport aux GSC.

Pour évaluer la pertinence physiologique de notre déduction, nous avons directement inhibé l'expression d'ARNT2 dans les GSC. La diminution d'expression après transduction des cellules par un ARN interférant est corrélée avec la réduction de la prolifération et de la réduction de l'expression de Nanog par les GSC. Ces résultats démontrent un rôle insoupçonné jusqu'à présent de ce facteur de transcription dans le maintien des propriétés des GSC. La diminution de l'activité du gène rapporteur dans lequel l'expression de la luciférase est placée sous le contrôle de « enhancer response elements » reconnus par HIF1 α , suggère que l'activité transcriptionnelle d'HIF1 α est altérée en absence de son co-facteur, ainsi que cela a pu être observé dans des cultures primaires de neurones, dans des cellules souches embryonnaires ARNT1^{-/-} et dans des hépatocytes ARNT1^{-/-} (*Maltepe et al., 2000*), dans le rein embryonnaire (*Freeburg et al., 2004*) et dans les cellules cancéreuses du sein (lignée MCF7) (*Qin et al., 2011*). Notamment, l'étude du Dr Sone (*Qin et al., 2011*) a montré que la diminution d'ARNT2 avec des siARN dans les cellules MCF7 conduit à une sous-expression des ARNm d'HIF1 α et de ses cibles. HIF1 α s'hétérodimérise obligatoirement avec l'un des membres d'ARNT. Ces études ont montré que dans certains types cellulaires, le co-facteur préférentiel d'HIF1 α était ARNT2 et que sa présence était nécessaire à l'activité d'HIF1 α .

ARNT2 est un facteur de transcription bHLH-PAS (basic helix loop helix with PAS domain) qui s'hétérodimérise également avec d'autres partenaires comme AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor), SIM1-2 (Single Minded 1-2), NPAS4 (Neuronal PAS 4) (*Hao et al., 2011 ; Dougherty et al., 2008 ; Woods et al., 2002*). Ces co-facteurs ne changent pas de marques dans les GSC-miR-302-367 (AHR garde une marque activatrice H3K4me3, SIM1 et NPAS4 gardent une

marque bivalente et SIM2 garde une marque répressive). Au niveau des taux de transcrits, seul AHR semble bien exprimé (niveau de transcrit >7) et on observe une réduction significative de ses transcrits dans les GSC-miR-302-367. Le couple ARNT2/AHR pourrait donc avoir également un rôle dans le maintien des propriétés souches, et il serait certainement intéressant d'évaluer l'impact de la diminution d'expression d'ARNT2 grâce à un gène rapporteur AHR. Ce couple de facteurs de transcription reconnaît des séquences XRE (xenobiotic response element) et régule le métabolisme des xénobiotiques (comme le gène CYP1A1 qui acquiert une marque répressive dans les GSC-miR-302-367) et par exemple l'interleukine 1 β (IL1 β) (qui perd la marque activatrice dans les GSC-miR-302-367). Il est en conséquence possible d'émettre l'hypothèse que la diminution d'ARNT2 via son impact sur l'hétérodimère ARNT2/AHR pourrait sensibiliser les cellules gliomales à une chimiothérapie.

Le lien indirect mis en évidence entre ARNT2 et LEF1 à l'issue de la recherche des interactions susceptibles de prendre place entre ARNT2 et les autres molécules membres du groupe de gènes activés dans les GSC-miR-302-367, ouvre par ailleurs la possibilité d'un contrôle de la voie de signalisation wnt par ARNT2. Cette possibilité reste à évaluer.

L'observation d'un effet stimulateur d'ARNT2 sur la croissance cellulaire et l'expression de Nanog dans des GSC dérivées de gliomes différents aux altérations génomiques distinctes indique que ce facteur de transcription tient une place centrale, insoupçonnée jusqu'à présent, dans la hiérarchie des gènes qui gouvernent les propriétés des GSC. Les fonctions d'ARNT2 ont été peu explorées et sa participation aux processus tumoraux est indéterminée.

5. Conclusions et perspectives

Parmi les travaux des projets auxquels j'ai participé, figurent l'identification pour la première fois des GSC issues de différents types et grades de gliomes pédiatriques, résistantes aux thérapies comme les GSC des gliomes de l'adulte et également les travaux sur l'identification d'un agent ciblant les GSC mais épargnant les NSC, le resvératrol.

Mes principaux travaux de recherche ont mis en évidence des changements discrets au niveau de la méthylation des histones des gènes des GSC ayant perdu leurs propriétés souches et tumorigènes et ont permis d'identifier des réseaux de gènes impliqués dans le maintien ou la perte des propriétés des GSC. L'analyse des données sur plusieurs niveaux (épigénomique, transcriptomique), à grande échelle (« genome wide ») est un outil précieux pour identifier des

profils moléculaires spécifiques des GSC en comparaison avec leur contrepartie GSC-miR-302-367 et pour d'autres types de cancers. Ainsi, ces analyses pourraient être le point de départ pour de futurs travaux afin de comprendre les propriétés souches des cellules cancéreuses de glioblastome mais surtout d'identifier les acteurs qui font passer la cellule d'un état souche à un état non souche et vice versa. En effet, d'après les résultats obtenus, plusieurs champs de recherche qui vont enrichir nos connaissances impliquées dans la régulation des propriétés souches et tumorigènes des GSC s'ouvrent :

- Un champ sur le métabolisme, où les premiers travaux ont montré de nouvelles altérations métaboliques liées à la voie de synthèse du GABA qui prennent place dans les GSC-miR-302-367, et où il serait intéressant de rechercher des liens entre les variations de marques épigénétiques observées sur différents gènes codant pour des enzymes du métabolisme et les modifications globales du métabolisme que nous avons déterminés grâce à la caractérisation des métabolomes des deux types cellulaires.
- Un champ sur les polycomb, où des membres des complexes polycomb, autre qu'EZH2 bien connu, sont également impliqués dans le contrôle des propriétés souches des GSC.
- Un champ sur l'identification de facteurs de transcription avec de nouvelles fonctions comme ARNT2 où son rôle dans les propriétés souches des GSC était inconnu, et où sa place d'importance par rapport à l'un de ses co-facteurs HIF1 α est mise en avant.
- Un champ sur la voie Wnt où LEF1 semble important dans le maintien des propriétés souches, qui reste à explorer.

Les études faites sur une lignée de GSC dérivée de GBM de l'adulte (TG1) et dont les résultats se retrouvent dans d'autres GSC de l'adulte (OB1) et dans des GSC issues de gliomes totalement différents (gliomes pédiatriques TP84) montrent que ces résultats sont transposables dans d'autres GSC et donc généralisable.

Enfin, ces analyses ouvrent des champs de stratégies thérapeutiques différentes, en cherchant des traitements induisant la différenciation afin d'éradiquer cette population de cellules souches dans les glioblastomes.

Annexes

Annexe 1 : Protocole détaillé du ChIP-seq

1. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Immunoprécipitation de la chromatine des cellules souches cancéreuses issues de gliomes avec des anticorps dirigés contre H3K4Me3 (marque de l'histone H3 permissive de la transcription) ou contre H3K27Me3 (marque de l'histone H3 répressive de la transcription).

1 ChIP = Un type de cellule et un type d'anticorps.

Selon l'analyse prévue des immunoprécipitats de chromatine (Q-PCR sur quelques loci ou ChIP-Seq) on a besoin de 0.024 à 20 ng d'ADN immunoprécipité (c'est-à-dire 1000-1,3 10^6 cellules).

Matériels:

- Prévoir au minimum pour chaque ChIP 4,3 10^6 cellules **VIVANTES** pour chaque condition analysée (2,1 10^6 cellules pour le ChIP, 200 000 cellules pour l'Input, 2 10^6 cellules pour l'extraction d'ARN).
- ChIP-IT[®] Express Chromatin Immunoprecipitation Kits. Active motif, Réf 53008.
- Paraformaldéhyde (PFA) en poudre. Sigma, Réf 15,812-7.
- Glycine en poudre. Sigma, Réf G7126.
- NaOH 1N en solution. Fluka, Réf 319511.
- PBS 10X. Invitrogen, Ref 14200-059.
- H₂O Braun. Braun Medical, Réf 0066571E.
- Purified BSA 100X. New England Biolabs, Réf B9001S.
- Proteaseinhibitors Cocktail « maison » :
 - BenzamidineHydrochloride : Hydrate en poudre. Sigma, Réf B-6506.
 - 1,10-Phenanthroline en poudre. Sigma, Réf P-9375.
 - Aprotinine en poudre. Sigma, Réf A1153.
 - Pepstatine A en poudre. Sigma, Réf P4265.
 - Leupeptine en poudre. Sigma, Réf L0649.
- Anticorps anti-trimethyl-histone H3 (Lys 27). Millipore. Réf 07-449.
- Anticorps anti-trimethyl-histone H3 (Lys 4). Millipore, Réf 07-473.
- MinElute Reaction Cleanup Kit. Qiagen, Réf 28204.

- Dounce homogenizer. Kimble Kontes, Réf 885302-0002 avec le tight-fitting « B » pestle.
- Dynamag®-Spin Magnet. Life technologies, Réf 123-20D.
- Qubit® 2.0 Fluorometer. Invitrogen, Réf Q32866. Avec le Qubit® dsDNA HS Assay Kit.
- Tubes et cônes DNase-RNase free

Préparation du PFA 37% :

Sous une Sorbonne (le PFA est très toxique, ne pas respirer).

Mélanger dans un Falcon de 15ml : 1,85 g de PFA qsp 5mL H₂O Braun + 70µL NaOH ou KOH 1N.

Bien vortéxer.

Faire bouillir dans un bain marie sur une plaque chauffante, jusqu'à obtenir une solution translucide en vortexant de temps en temps (environ 20min).

Laisser refroidir avant utilisation.

La solution stock peut être conservée à -80°C ou -20°C pendant un mois, toutefois il est recommandé d'utiliser une solution fraîchement préparée pour maximiser le taux de réussite du CHIP.

Préparation de la glycine 1,25M :

Masse molaire = 75,07g/mol

Mélanger dans un Falcon de 15 ml : 0,938 g de Glycine et 8 ml H₂O Braun.

Bien vortéxer jusqu'à dissoudre entièrement la Glycine.

Compléter à 10 ml avec de l'H₂O.

La mettre immédiatement dans la glace jusqu'à utilisation.

La solution stock peut être conservée à 4°C au maximum 6 mois, toutefois il est recommandé d'utiliser une solution fraîchement préparée.

Préparation du ProteaseInhibitors Cocktail « maison » :

Les inhibiteurs de protéases sont rapidement inactivés en solution aqueuse et doivent être ajoutés au dernier moment à la solution avant utilisation.

Dissoudre les inhibiteurs suivants dans 10 ml d'EtOH 100% :

Inhibiteur	Quantité pour 10mL de cocktail
Benzamidine HCL	16 mg
Phenanthroline	10 mg
Aprotinine	10 mg
Pepstatine A	10 mg
Leupeptine	10 mg

Bien vortexer la solution jusqu'à obtenir une suspension trouble (certains composants ne sont pas complètement solubles dans l'EtOH 100%).

Aliquoter à 500 µL/tube.

Stocker à -20°C, stable au maximum 6 mois.

Préparation du PBS 1X :

Mélanger 100 ml du PBS 10X à 900 ml d'H₂O Braun.

Bien agiter.

Stocker à 4°C, stable pendant 2 semaines.

1.1. Fixation des cellules:

Sous la hotte de culture

- Cellules poussant sous la forme de sphères flottantes.
- Collecter les cellules des flask T75 dans un tube Falcon de 50 ml. Les cellules ont été préalablement dissociées 48h avant afin de ne pas les traumatiser et provoquer leur mort à cause de la dissociation mécanique, et afin qu'elles soient en phase de prolifération.
- Centrifuger 5 min, 800 rpm (centrifugeuse Beckman du P2, accélération 5, frein 3), 23°C.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 200 µL de milieu de culture.

- Avec une P200 ajusté à 180 µL, dissocier doucement les sphères (3 fois 50 aller-retour avec la pipette).
- Prélever 5 µL de la suspension (préalablement mélangée pour avoir une suspension homogène).
- Les mélanger avec 5 µL de bleu de trypan (2 aller/retour).
- Laisser incuber 3 min à température ambiante (TA).
- Déposer ce mélange dans une cellule de Kova slide (ou une cellule de Mallassez)
- Pour la Kova slide, compter les cellules blanches (vivantes=V) puis les cellules bleues (mortes=M) dans 9 carreaux : nombre de cellules vivantes/µl = $V \times 9 \times 2$ (le 2 correspondant à la dilution avec le bleu de trypan).
- Déterminer le nombre de cellules vivantes totales et le % de viabilité (doit être > 80%).

Cellules pour l'extraction d'ARN

- Transférer 2 10⁶ de cellules pour la préparation de l'ARN dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.
- Centrifuger brièvement (30 sec, centri de table).
- Eliminer le surnageant.
- Rincer avec 1 ml PBS 1X.
- Centrifuger brièvement (30 sec, centri de table).
- Eliminer aussi **complètement** que possible le surnageant.
- Congeler immédiatement à -80°C.

Cellules pour les ChIPs

- Transférer le nombre de cellules ad hoc pour la préparation du ChIP dans un tube Falcon de 15 ou 50 ml. Ajuster le volume avec le milieu de culture à 10⁶ cellules/ml. (Ne pas oublier le besoin de 4 10⁶ cellules pour chaque ChIP). Par exemple, transférer 10 10⁶ cellules dans un Falcon de 50 ml et ajuster le volume à 10 ml.
- Ajouter 54,8 µL de PFA 37% par 10 ml de suspension cellulaire initiale. Concentration finale de PFA : 0,5%.
- Immédiatement fermer le tube et inverser plusieurs fois le tube. (La solution devient jaune).
- Incuber 10 minutes à TA. Mélanger en inversant le tube à intervalles réguliers.

- Ajouter 440 µl de Glycine 1.25 M par 10 ml de suspension cellulaire initiale. Concentration finale de glycine : 0.125 M.
- Incuber 5 minutes à TA. Mélanger en inversant le tube à intervalles réguliers.
- Centrifuger 5 min à 450 g, 4°C.
- Eliminer le surnageant dans un container spécifique aux déchets PFA.
- Rincer 2 fois avec du PBS 1X (utiliser 10 ml de PBS / 10 ml de suspension cellulaire initiale pour chaque rinçage), centrifuger 5 min à 450g, 4°C, éliminer le surnageant dans le container spécifique aux déchets PFA.
- Préparer le PBS + inhibiteurs de protéases en ajoutant 10 µl de ProteaseInhibitors Cocktail « maison » / 1 ml PBS 1X.
- Resuspendre le culot cellulaire avec 2,5 ml de PBS + Inhibiteurs de protéases / 10 ml de suspension cellulaire initiale.
- Aliquoter à 4 10⁶ cellules / ml / tube.
- Centrifuger 10 min à 15 600 rpm, 4°C.
- Eliminer le surnageant. Faire un snapfreeze (plonger le culot dans de la carboglace ou de l'azote liquide pendant quelques secondes).
- Conserver au – 80°C jusqu'à utilisation (durée maximale de stockage : 6 mois)

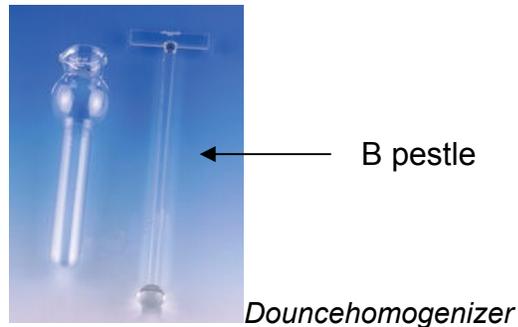
1.2. Lyse et Sonication :

Important, vortexer les solutions uniquement quand c'est précisé

Préparation du Lysis buffer et du Shearing buffer avec le PIC (Protase Inhibitor Cocktail) et le PMSF (tous les 4 provenant du kit d'Active Motif) :

- Sortir du -20°C ces produits
- Laisser décongeler à TA les tampons et dans la glace le PIC et le PMSF.
- Une fois décongelés, ajouter au Lysis buffer et au Shearing buffer le PIC et le PMSF (5µl/ml). Par exemple, ajouter 7.5µl de PIC + 7.5µl de PMSF / 1.5ml de Lysis buffer, et ajouter 2.5µl de PIC + 2.5µl de PMSF / 500µl de Shearing buffer.
- Sortir au dernier moment les tubes contenant les culots cellulaires fixés du -80°C.
- Les laisser décongeler sur la glace (2-3 min).
- Ajouter 1.5ml de Lysis buffer supplémenté avec le PIC et le PMSF au culot congelé (24 millions de cellules, soit 6 tubes contenant 4 10⁶ cellules/tube) ou 1ml pour 15 10⁶ cellules.

- Faire quelques allers-retours avec la P1000 pour resuspendre le culot.
- Immédiatement prélever un aliquot et déposer sur une lame pour le contrôle non lysé.
- Incuber 30 min dans la glace.
- Pendant ce temps d'incubation, refroidir le Douncehomogenizer dans la glace.
- Transférer les 1.5ml dans le Douncehomogenizer pré refroidi.
- Faire 20 aller-retour avec le B pestle sur la glace.



- Il est possible d'homogénéiser avec une seringue Hamilton à la place du Dounce mais pour de plus petits volumes.
- Prélever un aliquot des cellules lysées et déposer sur la lame contenant déjà le spot contrôle des cellules non lysées.
- Vérifier sous microscope que la membrane plasmique s'est rompue. Si nécessaire, répéter les allers/retours avec le Dounce.
- Centrifuger 10 min à 2.400 RCF à 4°C pour culoter les noyaux.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 500 µl de Shearing buffer supplémenté avec le PIC et le PMSF aux 24 millions de cellules lysées (ou 350 µl pour 15 10⁶ cellules lysées).
- Resuspendre le culot en faisant quelques aller-retour avec une P1000.
- Séparer en 2 tubes égaux de 250 µl (étape inutile pour un volume de 350 µl).
- Nettoyer la sonde du vibra cell (sonicateur à sonde Sonics) avec un produit désinfectant.
- Soniquer une fois avec un tube contenant de l'H₂O distillé (250 µL) et une fois avec un tube contenant du shearing buffer seul (250 µL). Essuyer avec un Kim wipes.
- Prélever un aliquot de 2.1 µl (100 000 cellules) dans un tube PCR pour la vérification de la qualité de la coupure de la chromatine sur gel d'agarose = **échantillon non soniqué (NS)**
- **Toutes les sonications suivantes se font avec les tubes placés dans un bac rempli de glace.**

- Soniquer chaque tube contenant les lysats cellulaires: 10 pulses d'amplitude 40% (20 sec ON, 50 sec OFF).
- Le volume pouvant être utilisé pour la sonication varie de 200 µL à 350 µL.
- Prélever un aliquot de 2.1 µl (100 000 cellules) dans un tube PCR pour vérifier la qualité de la coupure de la chromatine sur gel d'agarose = **échantillon soniqué (S)** (ou 2.3 µl pour l'exemple avec 15 10⁶ cellules).
- Aliquoter la chromatine soniquée à 50 µl / tube
- Conserver au – 80°C jusqu'à utilisation (durée maximale de stockage testée: 1 semaine. Pas d'indication de temps de stockage maximum par Active motif).

1.3 Vérification de la qualité de la coupure de la chromatine :

Purification et précipitation de l'ADN :

- Compléter le volume des échantillons non soniqué (NS) et soniqué (S) à 200 µl final avec de l'H₂O distillé.
- Ajouter 10 µl de NaCL 5M (du kit ChIP IT express).
- Vortexer très rapidement à faible vitesse.
- Incuber dans un thermocycler 15 min à 95°C.
- Centrifuger brièvement les tubes PCR avec une centri de table pour faire retomber les gouttes du bouchon.
- Ajouter 1 µl de RNase A (du kit ChIP IT express).
- Vortexer très rapidement à faible vitesse.
- Incuber dans un thermocycler 15 min à 37°C.
- Centrifuger brièvement les tubes PCR avec une centri de table pour faire retomber les gouttes du bouchon.
- Ajouter 1 µl de Protéinase K (du kit ChIP IT express).
- Vortexer très rapidement à faible vitesse.
- Incuber dans un thermocycler 15 min à 67°C.
- Centrifuger brièvement les tubes PCR avec une centri de table pour faire retomber les gouttes du bouchon.
- Transférer les échantillons dans des tubes de 1.5 ml.
- Ajouter 200 µl de phénol-Tris pH8 / chloroforme (1 :1).
- Vortexer à forte vitesse pendant 20 secondes environ.

- Laisser à TA pendant 5 min.
- Centrifuger à vitesse maximum, 5 min à TA.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube de 1.5 ml (**attention à ne pas prélever l'interface protéique**).
- Ajouter **dans l'ordre** : 20 µl de Sodium acetate 3M pH 5.1 (préparé en dH₂O, pH ajusté avec HCl fumant, autoclave, stocké à 4°C ou room température), 1 µl Glycogène (Invitrogen, 20-35 mg/ml), 500 µl EtOH 100% stocké à -20°C.
- Vortexer à forte vitesse pendant 20 secondes environ.
- Incuber 1 h à -80°C ou toute la nuit à -20°C.
- Centrifuger à 4°C, 15 minutes à vitesse maximum.
- Eliminer le surnageant.
- Rincer le culot avec 500 µl d'EtOH 70 stocké à -20°C
- Centrifuger à 4°C, 5 minutes à vitesse maximum.
- Eliminer le surnageant.
- Laisser sécher le culot sous la Sorbonne environ 5 minutes.
- Reprendre le culot avec 15 µl d'H₂O.
- Mesurer la concentration au Nanodrop avec 2 µl.
- Ajouter aux 13 µl restants 5 µl de loading buffer sans bleu de bromophéno (Pour 1 ml final de loading buffer : 500 µl de glycérol + 100 µl TAE 10X + 400 µl d'H₂O).

Préparation du gel d'agarose 1% :

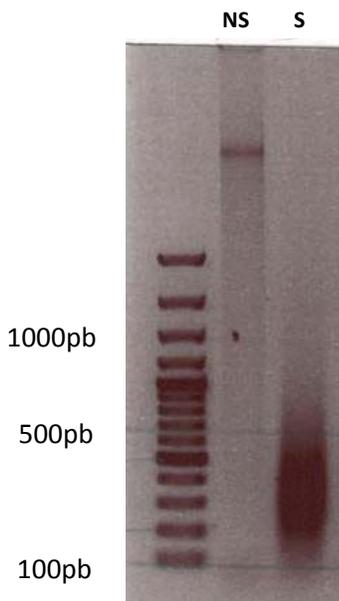
- Mettre 0.6 g d'agarose dans un Erlenmeyer.
- Ajouter 60 ml de TAE 1X.
- Dissoudre complètement l'agarose dans le tampon dans un four à micro-ondes en agitant de temps en temps.
- Ajouter 3 µl de Bromure d'éthidium.
- Immédiatement remuer pour homogénéiser la solution.
- Laisser refroidir jusqu'à ce que le liquide soit tiède.
- Couler l'agarose dans le moule avec le peigne et laisser refroidir. (Il est possible de conserver le gel dans du film plastique à 4°C pendant quelques jours.)

Electrophorèse :

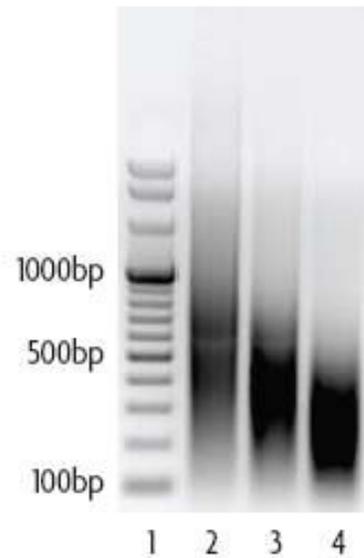
- Placer le gel dans la cuve.

- Le recouvrir de Tampon TAE 1X.
- Retirer le peigne.
- Charger les échantillons (18 μ l) et un standard de poids moléculaires (10 μ l, 100 bpladder).
- Faire migrer 1 heure à 100V.
- Visualiser l'ADN sous UV et prendre une photo.

Exemples d'une bonne et mauvaise coupure de la chromatine :



Exemple d'une bonne coupure
de la chromatine (entre 200 et 500pb).



Puit 1 : Standard 100-1000pb

Puit 2 et puit 4 : exemple d'une mauvaise
coupure (puit 1 : pas assez coupé ; puit 4 :
trop coupé)

Puit 3 : Coupure optimale (entre 200 et
500pb)

1.4 Immunoprécipitation de la Chromatine :

- Prévoir 3 tubes pour chaque ChIP (on ne peut traiter que 700 000 cellules au maximum par tube et on a besoin de $2,1 \cdot 10^6$ cellules au minimum pour chaque ChIP).
- Sortir les produits (PIC, ChIP Buffer 1, BSA) du -20°C et la chromatine soniquée du -80°C et décongeler sur la glace.

Dans chaque tube, ajouter dans l'ordre :

1.	sterile dH ₂ O	118,4 μl
2.	BSA	10 μl
3.	ChIP Buffer 1	20 μl
4.	Protease inhibitor cocktail (PIC)	2 μl
5.	Protein G magneticbeads (vortexer les billes avant de les pipetter)	25 μl
6.	Shearedchromatin	14,6 μl
Total volume		200 μl

- Faire quelques aller-retour avec la P200.
- Incuber 1h à 4°C
- Ajouter 10 μl d'anticorpsanti-trimethyl-histone H3 (Lys 27) ou anti-trimethyl- histone H3 (Lys 4).
- Faire quelques allers-retours avec la P200.
- Placer les tubes sur la roue et incuber 15 hrs sur la nuit à 4°C .

1.5 Lavages des billes magnétiques :

- Placer les tubes sur le Dynamag-Spin magnet pour compacter les billes sur la paroi du tube.
- Eliminer soigneusement le surnageant à l'aide d'un cône de 200 μl .
- Laver les billes 1 fois avec 800 μl de ChIP buffer 1 (resuspendre les billes avec la pipette **NE PAS VORTEXER**).

- Laver les billes 2 fois avec 800µl de ChIP buffer 2 (resuspendre les billes avec la pipette **NE PAS VORTEXER**).

F/ Reverse Cross-Link et Elution des chromatines immunoprécipitées et des inputs:

Cette étape a pour but de décrocher la chromatine des billes magnétiques et de « déposer » l'ADN des histones (reverse cross-link).

1. ChiPs :

- Préparer 3 tubes PCR pour chaque ChIP.
- Resuspendre les billes avec 50µl d'Elution buffer AM2 (en faisant quelques aller-retour à la pipette P200).
- Incuber 15 minutes à température ambiante sur la roue.
- Ajouter 50µl de Reverse Cross-linking buffer, faire quelques allers-retours avec la pipette et immédiatement placer les tubes sur l'aimant.
- Récupérer le surnageant contenant la chromatine dans un tube PCR (3 tubes PCR par lignée et par anticorps)

2. Inputs :

- Utiliser les tubes « Input DNA » (aliquots de 4.2µl correspondant à 200 000 cellules)
- Ajouter dans chaque tube d'input:
 - 93.8µl de ChIP 2 buffer
 - 2µl de NaCL 5M

3. ChiPs et Inputs :

- Incuber les ChiPs et les Input DNA dans un thermocycler pendant 5h à 65°C pour déposer l'ADN des histones (reverse crosslink).

1.6 Purification et extraction de l'ADN :

Placer les tubes à température ambiante à l'issue de l'incubation de 5 h.

Centrifuger brièvement.

- Ajouter dans chaque tube 1µl de RNAse A (du kit ChIP IT express).

- Vortexer très rapidement à faible vitesse.
- Incuber dans un thermocycler 15 min à 37°C.
- Centrifuger brièvement les tubes PCR avec une centri de table pour faire retomber les gouttes du bouchon.
- Ajouter dans chaque tube 2µl de Protéinase K (du kit ChIP IT express).
- Vortexer très rapidement à faible vitesse.
- Incuber dans un thermocycler 1,5 h à 42°C.
- Centrifuger brièvement les tubes PCR avec une centri de table pour faire retomber les gouttes du bouchon.
- Ajouter dans chaque tube 2µl de Protéinase K stop solution (du kit ChIP IT express).
- Pooler dans un tube eppendorf de 1.5ml les 3 tubes PCR correspondant au même ChIP (volume total de 300µl pour les ChIPsamples).
- Transférer dans un tube de 1,5 ml les 100µl des inputs.

Extraction de l'ADN avec le kit MinElutereactioncleanup kit de Qiagen selon les instructions du fabricant soit :

1. Ajouter 900µl du tampon ERC aux 300µl des ChIPsamples.
2. Ajouter 300µl du tampon ERC aux 100µl des inputs
3. Vérifier que la couleur du mélange reste jaune ($\text{pH} \leq 7.5$) Si la couleur est violette (pH trop haut), ajuster le pH en ajoutant 10 µl de sodium acétate 3M, pH 5.0.
4. Déposer le mélange dans la MinElute colonne préalablement placée dans un tube collecteur. Dépôt réalisé en deux fois pour les ChIPsamples et en une fois pour les inputs.
5. A chaque dépôt, centrifuger à 10,000 x g à température ambiante pendant 1 minute (fixation de l'ADN sur la membrane de la colonne).
6. Eliminer l'éluat collecté après chaque centrifugation.
7. Laver les colonnes avec 750µl de tampon PE.
8. Centrifuger à 10,000 x g à température ambiante pendant 1 minute
9. Eliminer l'éluat collecté.

10. Centrifuger à 10,000 x g à température ambiante pendant 1 minute à vide pour éliminer toute trace d'éthanol du tampon PE.
11. Placer les colonnes dans un tube de 1.5ml.
12. Déposer bien au centre de la membrane de la colonne 10µl du tampon EB (10mM Tris-Cl, pH 8.5). Faire attention à ne pas toucher la membrane.
13. Incuber 1 minute à température ambiante.
14. Centrifuger à 10,000 x g à température ambiante pendant 1 minute.
15. Déposer la colonne dans un nouveau tube et répéter les étapes 12 à 14.
16. Pooler les 2 éluions. On doit récupérer un volume de 18 µl au total.
19. Mesurer la concentration d'ADN avec un QuBit (Invitrogen).

On attend comme quantité :

- Pour une IP avec H3K4me3 à partir de $2,1 \cdot 10^6$ cellules, on attend entre 30 et 50 ng d'ADN (mesure au QuBit), correspondant à 200-300 ng sur le nanodrop.
- Pour une IP avec H3K27me3 à partir de $2,1 \cdot 10^6$ cellules, on attend entre 150 et 200 ng d'ADN (mesure au QuBit), correspondant à 1000-1300 ng sur le nanodrop.
- Pour l'Input entre 1,2 et 1,7 µg d'ADN (mesure au QuBit), correspondant à 2-2,5 µg sur le nanodrop

Soit un rendement autour de 0.3% pour la marque activatrice H3K4me3 et autour de 1% pour la marque répressive H3K27me3.

20. 20 ng d'ADN (immunoprécipités et inputs) sont nécessaires pour un séquençage.
21. Stocker le reste à -20°C (durée maximum de stockage : plusieurs années)

2. Séquençage à haut débit

Procédures expérimentales réalisées par la plateforme MGX à Montpellier dirigé par Laurent Journot

2.1. Préparation de la banque de ChIP-Seq

La préparation de la banque se fait à l'aide d'un kit DNA Seqsampleprep. Kit d'Illumina. Elle comprend 5 étapes :

1. Une réparation des extrémités des fragments d'ADN
2. L'ajout d'une base A à ces extrémités
3. La ligation d'adaptateurs à ces extrémités
4. Une purification sur gel permettant une sélection de taille (320 pb +/- 25)
5. Une étape d'amplification par PCR. Cette étape permet aussi une sélection puisque seuls les fragments portant les deux types d'adaptateurs (cf étape 3) seront amplifiés

La validation de la banque est réalisée grâce à une quantification (concentration et taille des fragments) de l'ADN sur puce Agilent DNA1000.

2.2. Génération des clusters et hybridation du primer de séquençage

Les différentes étapes qui vont suivre sont réalisées à l'intérieur d'une Flow-cell sur un appareil appelé cBot à l'aide d'un kit cluster generation kit d'Illumina.

La Flow-cell est une lame de verre sur laquelle sont coatées de façon covalente des séquences d'ADN complémentaires de celles des adaptateurs qui ont été ajoutées aux fragments d'ADN lors de la constitution de la banque.

Chaque Flow-cell possède 8 pistes et permet donc de traiter 8 banques en même temps de façon indépendante.

La piste 4 est réservée au contrôle PhiX (voir annexe 1 pour plus de détails).

La cBot est composée d'un bloc chauffant/refroidissant qui accueille la Flow-cell et d'une partie qui va accueillir les réactifs. Un système de pompe et de tubulure permet d'amener les réactifs à la Flow-cell et de les injecter dans chaque piste.

Cette cBot permet de réaliser 5 étapes qui sont, dans l'ordre chronologique :

1. l'hybridation des fragments d'ADN constituant la banque à la Flow-cell
2. l'amplification de ces fragments une fois fixés à la Flow-cell. Cette amplification est isotherme et est rendue possible par la formation de ponts d'ADN. Elle permet la génération de clusters d'ADN (population clonale de fragments d'ADN)
3. la linéarisation des sus-dit ponts d'ADN
4. le blocage de l'extrémité libre des fragments d'ADN fixés à la Flow-cell
5. la dernière étape correspond à l'hybridation du primer de séquençage sur l'extrémité libre des fragments d'ADN fixés à la Flow-cell

L'optimisation du séquençage qui aura lieu lors de l'étape suivante est intimement liée à la densité des clusters présents sur la Flow-cell à l'issue des 5 étapes décrites ci-dessus. C'est pourquoi chaque banque est dénaturée puis diluée à 7 pM avant d'être injectée (90 µl par banque) et hybridée à la Flow-cell.

2.3. Le séquençage

Il est réalisé sur un HiSeq 2000 d'Illumina grâce à la technique SBS (Sequence By Synthesis). Il s'agit de l'incorporation et de la détection séquentielle de nucléotides par polymérisation en se servant des clusters d'ADN fixés à la Flow-cell comme matrice. Chaque type de nucléotide qui va permettre cette réaction est marqué avec un fluorochrome (émettant après excitation à une longueur d'onde donnée) et un agent bloquant qui empêchera l'incorporation de plusieurs nucléotides lors d'un même cycle de SBS.

La partie optique du séquenceur est constituée de 2 lasers, de 2 filtres et de 4 caméras numériques (une par nucléotide).

A la fin de chaque cycle de SBS, un tampon de clivage sera injecté dans chaque piste, permettant la coupure du fluorochrome et de l'agent bloquant pour chaque nucléotide incorporé. Ceci permettra l'incorporation d'un nouveau nucléotide lors du cycle suivant.

On peut donc décrire chaque cycle de SBS comme suit :

- lavage

- incorporation d'un nouveau nucléotide
- lavage
- détection
- lavage
- clivage

Chaque piste (Lane) de la Flow-cell v3 est divisée en trois colonnes ou Swaths, correspondant à la largeur de balayage de la caméra. La caméra lit en continue la fluorescence, le laser rouge précédant le laser vert. Le logiciel HiSeq Control Software (HCS) divise 1 Swath en 16 portions (Tiles) pour l'analyse d'images. Au total, on aura 96 tiles par piste soit 48 par face (Top et Bottom).

Le contrôle de la qualité du run de séquençage se fait à l'issue du premier cycle, une fois la première base incorporée. Un rapport est alors généré sur l'analyse de cette première base permettant ainsi d'estimer :

- la densité en cluster sur chaque piste de la Flow-cell
- l'intensité du signal généré
- la qualité du focus de l'appareil

Ce focus est réalisé de façon automatique et dynamique.

2.4. Informatique

Pré-traitement informatique

Analyses d'images : Les analyses d'images sont réalisées avec le logiciel HiSeq Control Software (HCS) d'Illumina. L'analyse d'images identifie la position des clusters, leurs intensités et le bruit associé.

Base Calling : Le basecalling est réalisé par le logiciel RTA fourni par Illumina. Cette étape permet de corriger les intensités et de transformer l'intensité en base nucléotidique. Cette phase se décompose en 3 étapes :

- les images sont tout d'abord corrigées pour tenir compte du recouvrement des spectres d'émission des 4fluorophores.
- les images subissent ensuite une déconvolution afin d'optimiser le signal de chaque pixel

- la conversion des intensités de fluorescence à chaque longueur d'onde en base nucléotidique est ensuite réalisée, en tenant compte, cluster par cluster, d'un éventuel déphasage de la synthèse d'ADN lors des cycles précédents.

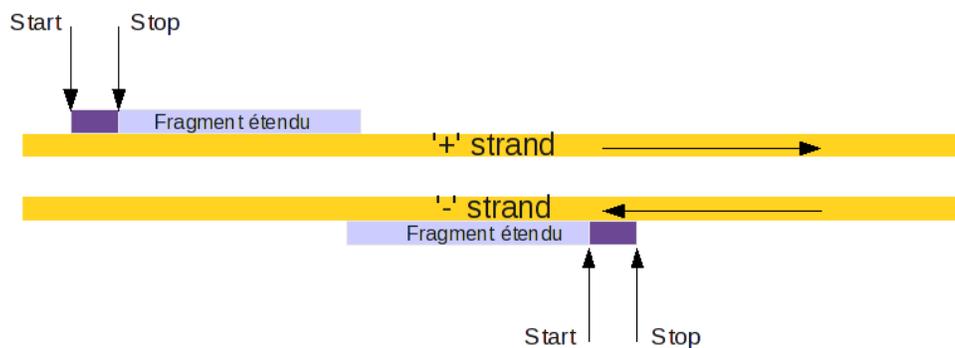
Analyse de séquences

Alignement de séquences : L'alignement de séquences est réalisé à partir du logiciel CASAVA (version 1.8.2) fourni par Illumina sur le génome de l'Homme (hg19). Cette étape permet d'aligner les séquences sur le génome, de filtrer les clusters. Les fichiers fournis ne contiennent que les tags qui s'alignent de manière unique sur le génome. Un maximum de 2 mismatches est autorisé lors de l'alignement sur les 32 premières bases (1ère seed). Un tag est considéré comme unique si :

- il s'aligne à une seule position sur le génome en Perfect Match (PM)
- il s'aligne à une seule position sur le génome avec 1 MisMatch (MM) s'il n'y a pas de PM.
- il s'aligne à une seule position sur le génome avec 2 MM s'il n'y a pas de PM ou de 1MM.

Alignement des seeds consécutives si pas de match ou multi matches.

Les tags ont une position "Forward" ou "Reverse" par rapport au brin de référence.



Voir Annexe 2 pour les résultats du séquençage.

Annexe 2

1. Description de l'expérience de ChIP-seq et résultats

La plateforme MGX (Montpellier GenomiX) a séquencé les six échantillons immunoprécipités :

-GSC Input (ADN des GSC soniqué mais non immunoprécipité),

-GSC H3K27me3 (nommé K27 pour la suite) (ADN des GSC immunoprécipité avec l'anticorps dirigé contre la marque répressive H3K27me3),

-GSC H3K4me3 (nommé K4 pour la suite) (ADN des GSC immunoprécipité avec l'anticorps dirigé contre la marque active H3K4me3),

-GSC-miR-302-367 Input (ADN des GSC-miR-302-367 soniqué mais non immunoprécipité),

-GSC-miR-302-367 H3K27me3 (nommé K27 pour la suite) (ADN des GSC-miR-302-367 immunoprécipité avec l'anticorps dirigé contre la marque répressive H3K27me3)

-GSC-miR-302-367 H3K4me3 (nommé K4 pour la suite) (ADN des GSC-miR-302-367 immunoprécipité avec l'anticorps dirigé contre la marque active H3K4me3) .

1.1 Analyse qualité de la piste contrôle

Afin de valider le run, une piste contrôle est utilisée contenant PhiX. Les librairies générées par ce virus servent de contrôle efficace pour séquencer le run. En effet, PhiX est un virus avec un petit génome bien caractérisé, offrant plusieurs avantages pour le séquençage et l'alignement. Il sert de contrôle également pour la génération de clusters. Si un problème se produit dans la préparation des échantillons, PhiX continuera à générer des clusters. Cela aide à discerner si un manque de clusters est dû à une erreur dans la préparation des échantillons ou une faille dans le processus de génération de clusters.

1.1.1 Qualité des séquences par base

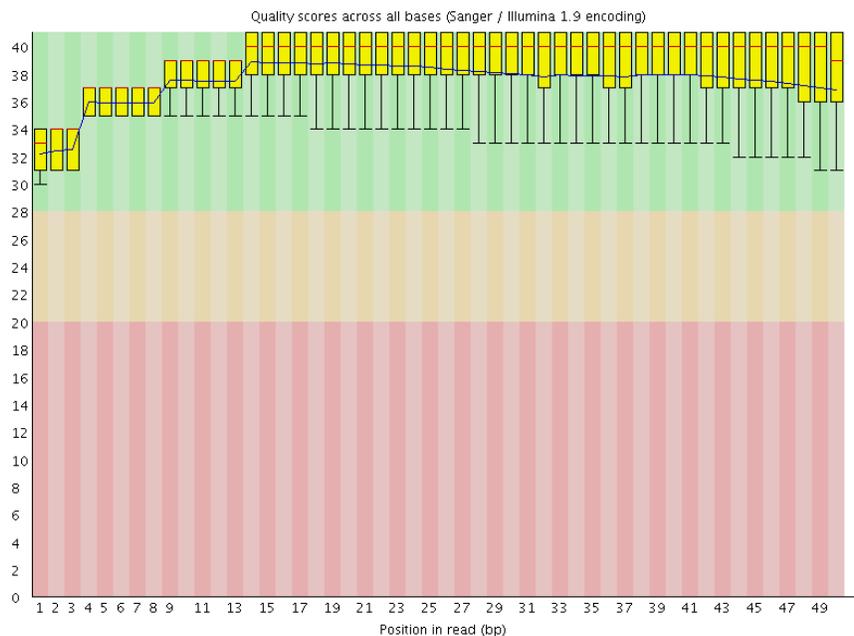


Figure 1 - Qualité par base pour la piste PhiX

La figure 1 montre la distribution des scores de qualité à chaque cycle.

Les éléments de ce boxplot sont les suivants :

- la ligne rouge dans chaque boxplot représente la médiane des scores de qualité
- la zone jaune représente l'écart interquartile, entre le 1er quartile (25%) et le 3ème quartile (75%)
- les traits noirs supérieurs et inférieurs représentent 10% et 90% des points de la distribution
- la ligne bleue représente la moyenne des scores de qualité

L'axe des ordonnées sur le graphique montre les scores de qualité :

Phred	Erreurs pendant le Basecalling	Précision
10	1/10	90%
20	1/100	99%
30	1/1000	99,9%
40	1/10000	99,99%

L'arrière-plan du graphique divise l'axe des ordonnées en 3 parties :

- en vert : très bonne qualité
- en orange : qualité raisonnable
- en rouge : mauvaise qualité

La piste contrôle montre que les différents cycles du run se sont bien déroulés avec une précision de 99.99%.

1.1.2 Qualité des séquences

La qualité moyenne par séquence permet de voir si un sous-ensemble de séquences a des valeurs de qualité faible.

En effet, il arrive que des séquences se trouvant en bordure de FlowCell aient des scores de qualité faibles ; ces séquences doivent représenter une faible proportion des séquences totales.

La figure 2 montre que la très grande majorité des séquences a une très bonne qualité.

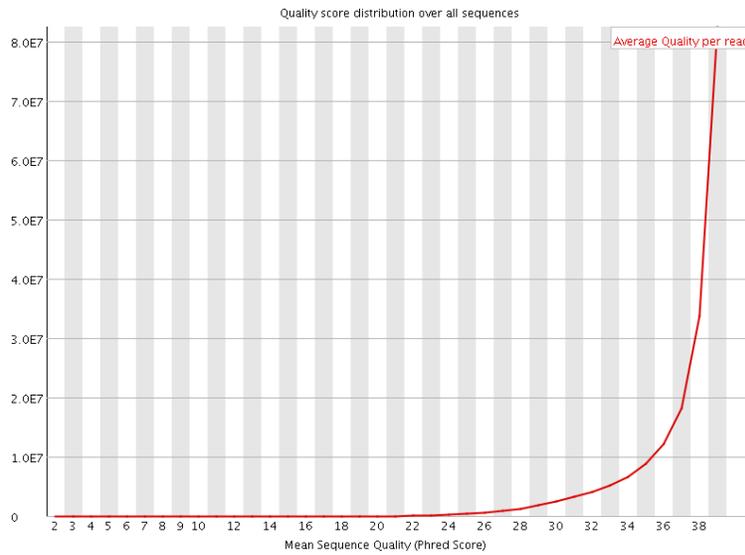


Figure 2 - Distribution des scores moyens de qualité par séquence pour la piste PhiX

1.1.3 Teneur en base N

Pendant le BaseCall, si on n'est pas capable de déterminer avec suffisamment de confiance quelle base est appelée, elle est substituée par un "N".

La présence de "N" peut être aussi due à un problème d'acquisition d'images pendant le séquençage.

La figure 3 montre qu'aucun cycle n'est affecté par la perte de bases pendant le run.

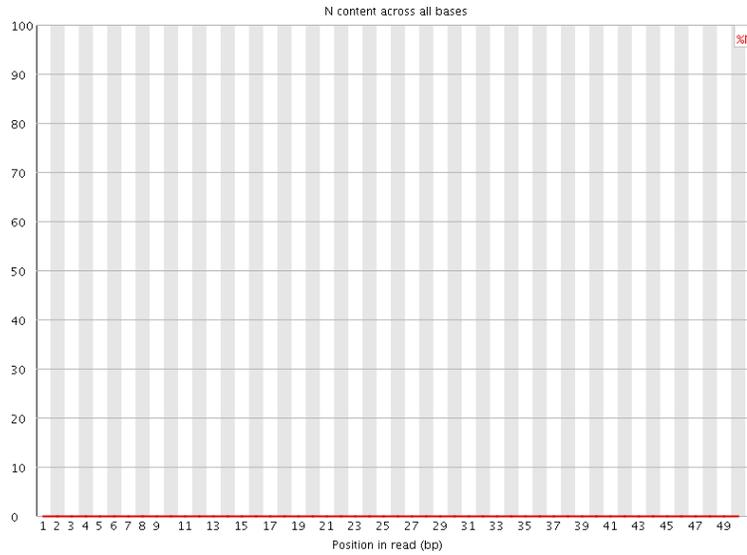
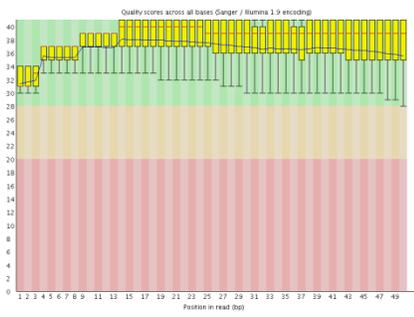


Figure 3 - Pourcentage de bases "N" par cycle pour la piste PhiX

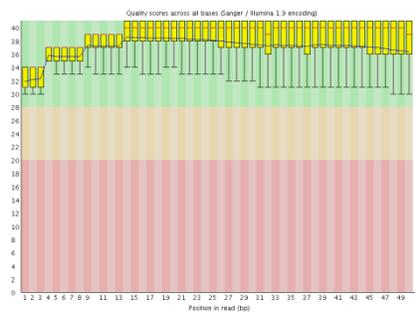
1.2. Analyse qualité des échantillons

1.2.1 Qualité des séquences par base

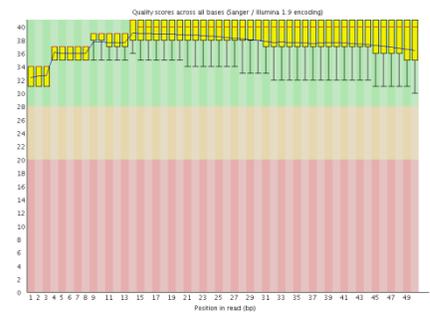
La figure 4 montre la distribution des scores de qualité à chaque cycle pour les différents échantillons.



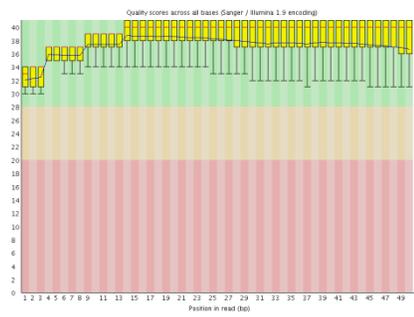
(a) échantillon GSC INPUT



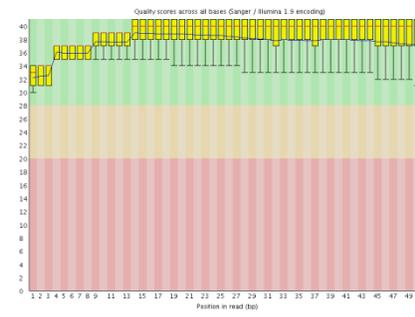
(b) échantillon GSC K27



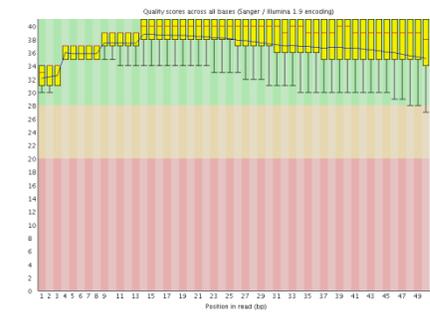
(c) échantillon GSC K4



(d) échantillon GSC-miR-302-367
INPUT



(e) échantillon GSC-miR-302-367
K27



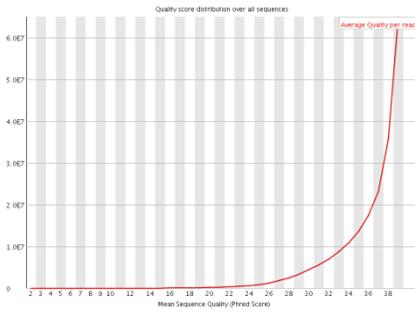
(f) échantillon GSC-miR-302-367
K4

Figure 4 - Qualité par base

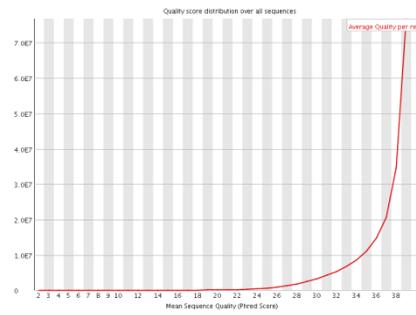
Pour les différentes pistes séquencées, la qualité des bases pour les différents cycles est très bonne, comme pour le contrôle PhiX.

1.2.2 Qualité des séquences

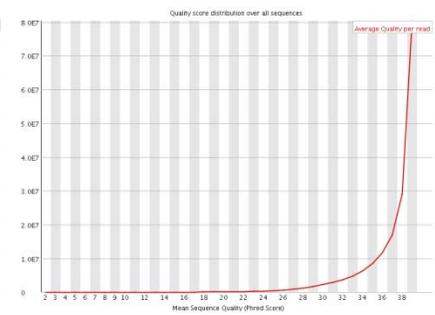
La figure 5 montre que les séquences de l'ensemble des échantillons sont de très bonne qualité.



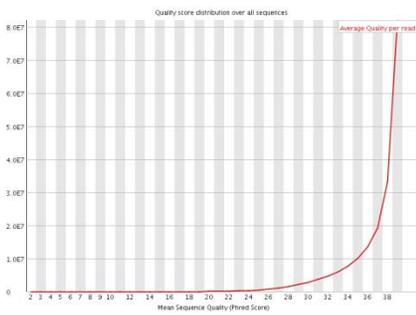
(a) échantillon GSC INPUT



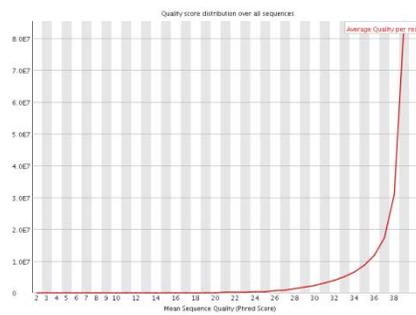
(b) échantillon GSC K27



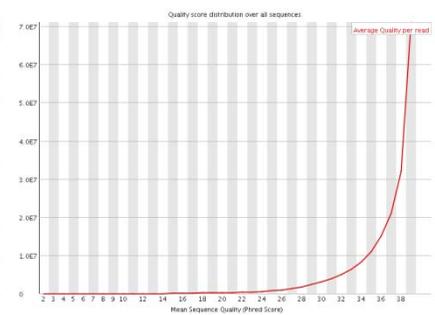
(c) échantillon GSC K4



(d) échantillon GSC-miR-302-367 INPUT



(e) échantillon GSC-miR-302-367 K27



(f) échantillon GSC-miR-302-367 K4

Figure 5 - Distribution des scores moyens de qualité par séquence pour les 6 échantillons

1.2.3 Teneur en base N

La figure 6 montre qu'aucun échantillon n'est affecté par des pertes de bases.

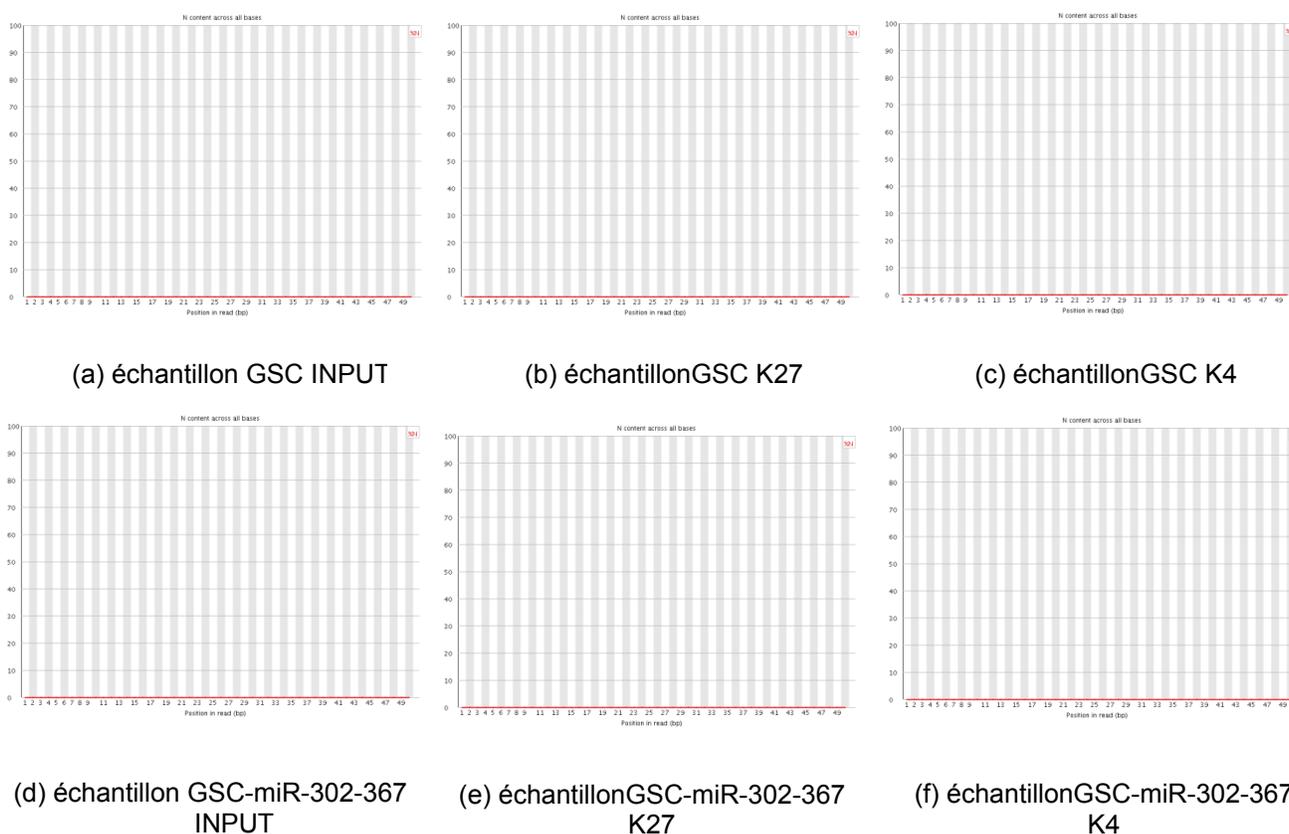


Figure 6 - Pourcentage de bases "N" par cycle

1.3 Résultats du séquençage et de l'alignement

Ci-dessous un tableau récapitulant les informations :

	Pis -te	CB	CAF	% (/CB)	TAG	% (/CAF)	MULTI	INCONNU
GSC INP	1	247 491 001	206 042 374	83.25	164 550 487	79.86	34 443 794	3 216 959
GSC K27	2	222 731 021	196 791 326	88.35	157 851 303	80.21	32 702 645	3 559 657
GSC K4	3	191 311 686	175 490 405	91.73	144 658 634	82.43	25 252 401	3 480 382

GSC-miR-302-367 INP	5	214 861 686	192 734 049	89.70	154 518 513	80.17	31 802 711	3 393 886
GSC-miR-302-367 K27	6	200 225 178	182 410 839	91.10	145 977 498	80.03	30 880 182	3 101 843
GSC-miR-302-367 K4	7	210 054 227	189 416 137	90.17	162 331 149	85.70	21 784 235	3 749 806

CB : Nombre de Clusters Bruts

CAF : Nombre de Clusters après le passage des filtres

TAG : Nombre de tags alignés uniques (1 seul perfect match ou 1 seul 1 mismatch ou 1 seul 2 mismatch)

MULTI : Nombre de tags qui s'alignent plusieurs fois sur le génome (plusieurs perfect match ou 1 perfect match et au moins 1 mismatch ou aucun perfect match et plusieurs 1 mismatch)

INCONNU : Nombre de tags qui ne s'alignent pas sur le génome (plus de 2 mismatches sur les 32 premières bases)

2. Analyses statistiques

Des analyses avec le logiciel MACS (v1.3.7.1) ont été réalisées. Quatre comparaisons ont été effectuées :

- GSC K27 vs GSC INP
- GSC-miR-302-367 K27 vs GSC-miR-302-367 INP
- GSC K4 vs GSC INP
- GSC-miR-302-367 K4 vs GSC-miR-302-367 INP

2.1 Diversité et couverture

Le tableau suivant montre la diversité des reads ainsi que la couverture du génome pour chaque échantillon.

TAG : Nombre de tags alignés uniques (1 seul perfect match ou 1 seul 1 mismatch ou 1 seul 2 mismatch)

TAG uniques : nombre de tags non redondants. Les tags redondants sont ceux situés exactement à la même position sur le génome (même chromosome/start/stop/brin).

Diversité : ratio du nombre de tags uniques sur le nombre de TAG.

Couverture (bp) : nombre de bases couvertes par les tags (nombre de bases lues)

Couverture (%/génome) : ratio du nombre de bases couvertes sur la taille effective du génome (2,7e+09 bp).

	TAG	TAG uniques	Diversi- té (%)	Couverture	Couverture (%/génome)
GSC INP	164 550 487	117 870 673	71,63	2 070 732 927	77
GSC K27	157 851 303	118 796 706	75,26	2 024 677 244	75
GSC K4	144 658 634	82 819 986	57,25	1 685 666 201	62
GSC-miR- 302-367 INP	154 518 513	114 422 178	74,05	2 040 048 529	76
GSC-miR- 302-367 K27	145 977 498	107 223 955	73,45	1 933 089 558	72
GSC-miR- 302-367 K4	162 331 149	48 737 196	30,02	1 048 771 609	39

Les différents échantillons présentent une bonne diversité et couverture dans l'ensemble. Seul l'échantillon GSC-miR-302-367 K4 présente une diversité et une couverture plus faibles.

2.2 Résultats de l'analyse sous MACS v1.4.2

Des analyses avec le logiciel MACS (v1.4.2) ont été réalisées pour les quatre comparaisons :

- GSC K27 vs GSC INP
- GSC-miR-302-367 K27 vs GSC-miR-302-367 INP
- GSC K4 vs GSC INP
- GSC-miR-302-367 K4 vs GSC-miR-302-367 INP

Elles ont permis d'identifier des régions enrichies dans les échantillons GSC K27, GSC-miR-302-367 K27, GSC K4 et GSC-miR-302-367 K4.

Le tableau suivant récapitule le nombre de pics identifiés.

Echantillons	Nombre de pics identifiés
GSC K27 (vs GSC INP)	23 969
GSC-miR-302-367 K27 (vs GSC-miR-302-367 INP)	18 614
GSC K4 (vs GSC INP)	26 998
GSC-miR-302-367 K4 (vs GSC-miR-302-367 INP)	32 287

3. Annotation des pics identifiés avec MACS v1.4.2

Les pics identifiés par MACS v1.4.2 ont été annotés en utilisant le gène le plus proche. Lorsque le gène le plus proche d'un pic est situé trop loin (à plus de 20kb), le pic n'est pas annoté.

Le fichier refFlat sorted.txt de UCSC (version : 22-Jan-2012) contient la description des gènes. Les GeneID utilisés proviennent du fichier gene2refseq.gz du NCBI (version du 23/01/2012), ce

fichier donne la correspondance entre le numéro d'accession refseq et le GeneID. La distance est calculée en amont du gène à partir du site "start" de transcription et en aval du gène à partir du site "end" de transcription.

Le tableau ci-dessous récapitule les résultats :

	Nombre de pics	Pics annotés
GSC K27 (vs GSC INP)	23 969	13 564
GSC-miR-302-367 K27 (vs GSC-miR-302-367 INP)	18 614	11 690
GSC K4 (vs GSC INP)	26 998	22 746
GSC-miR-302-367 K4 (vs GSC-miR-302-367 INP)	32 287	26 609

Nous pouvons remarquer que les pics annotés pour les échantillons K4 sont plus nombreux que ceux pour les échantillons K27.

Annexe 3 : Tableau supplémentaire 1

Tableau supplémentaire 1 : Gene Ontology

Genome Wide Changes in Epigenetic Profiles by ChIP-seq (Figure 10)		
Termes GO	P-value	Nom des gènes
biological adhésion/cell-cell signaling	4,5 x 10 ⁻²²	MPZL3, MTSS1, CADM3, LYPD3, RADIL, CDH22, DAB1, CD44, CTGF, TGFBI, ROBO2, ADAM8, DSCAM, PTPRF, EFNB1, CDHR1, COL22A1, CDHR2, ACTN2, SIRPA, BCL2L11, CTNNA3, THY1, NCAM1, HES1, PODXL2, LAMC3, ROR2, COL24A1, UNCX, ACHE, ITGAE, COL28A1, SCRIB, ALCAM, LAMB2, PVRL1, TEK, BAI1, TTYH1, SSX2IP, FN1, TECTA, B4GALT1, ADAM23, PCDH19, LAMA1, CASS4, TSC1, ITGA6, PKP3, PKP4, HABP2, CLDN9, CLSTN3, MYBPC1, NPNT, PCDHA1, PCDHGA1, CD96, WISP2, BARX2, CHST10, DGCR6, LOXL2, COL11A1, CEACAM1, ALX1, CNTN5, CNTNAP5, ICAM2, STXBP1, LEF1, PCDH8, PCDH7, AMIGO1, AMIGO2, SIGLEC1, CD99L2, CNTN1, CNTN4, VCAN, SEMA4D, PARVB, PARVA, PPFIA2, TNC, SPOCK1, CLDN10, CBLL1, CLDN12, CDH4, CDH6, CDH8, CD9, GP1BB, ROPN1B, TNR, COMP, COL6A2, COL6A1, TNN, COL8A1, THBS2, FLRT2, HAPLN1, TNXB, OLR1, PLEK, GMDS, COL13A1, NLGN1, NFASC, HSPG2, COL5A1, COL4A6, VWF, CDH16, SNED1, FBLN5, FBLN7, BMPR1B, NTM, FEZ1
Cell-cell signaling/synaptic transmission	2,6x 10 ⁻²²	NAMPT, FGF5, EFNA1, GRIK2, EFNA2, EFNA3, CGB7, FGF12, VIPR1, IL11, WISP2, BARX1, WNT4, GRIN2B, GATA4, GRID2, TRPV4, PTPRF, STC2, ALDH5A1, BAIAP3, EFNB1, SIX3, PCDH8, FGF20, GAL, PCLO, GRM5, SMO, INHBA, SSTR2, GRM2, SSTR3, GRM8, CHRM1, WNT9B, STC1, EFNA5, TFAP2C, TSHR, WNT5A, PPFIA3, ACHE, SCN1B, CPLX1, GRAP, CACNB2, MME, CACNB4, EPHB1, CCL26, HRH1, MUSK, PVRL1, SYN1, CCL21, SYN3, TEK, SYN2, ADRA2B, PRIMA1, HTR3A, SNAP25, HAP1, WNT8B, COL4A4, BMP4, HCN2, GLRB, BMP2, PLP1, GABRA2, TBX3, NLGN1, SNAI2, TNFSF9, DBH, NPY5R, LIN7A, GJB2, P2RX7, TNFSF10, GRIA2, CXCL14, CXCL13, P2RX3, NTRK2, MYCBPAP, ADRA1B, CACNA1E, RIT2, GHSR, WNT7A, NR5A1

regulation of cell death	3,9x 10-15	PTGS2, GRIK2, ARNT2, FOXO3, IL31RA, CTNBL1, CUL3, PTGIS, CD44, TIAM1, GRID2, ZNF443, MX1, WWOX, NMNAT3, PRAME, SOCS2, PTPRF, ADAMTS20, ACTN2, FADD, LIG4, HBXIP, MARK4, BCL2L11, SSTR3, VEGFA, TNFAIP3, PRODH, KALRN, GSDMA, TAF9B, CLU, BDKRB2, RRM2B, TIMP3, SCRIB, PLAGL1, NKX3-2, BMF, NKX2-5, RUNX3, FGD3, ANGPTL4, TRAF3, B4GALT1, BMP4, BHLHE23, TP53BP2, EEF1A2, NR4A1, CIDEA, VAV2, P2RX7, TNFSF10, SFRP1, BBC3, ETS1, NTRK1, PLCG2, IKBKB, BMP7, PREX1, MCF2L, ARHGAP4, PAK7, BOK, PAX7, CHST11, NRG1, DEDD2, TERT, GHR, KNG1, AIFM3, ARHGEF18, RXFP2, ESR1, IL6R, NLRP3, GAL, NLRP1, JMY, ARHGEF11, DAPK1, PROC, CARD11, SMO, AMIGO2, PROK2, INHBA, ADRB2, TNFRSF10D, IL12A, FOXC2, FOXC1, KCNH8, SEMA4D, PRNP, GSTP1, ACVR1, CCK, ASNS, ZBTB16, KIT, ERCC6, SH3GLB1, COMP, TGM2, PCSK9, POU3F3, INPP5D, NEFL, PHLDA3, NGEF, CEBPB, TBX3, MAL, DBH, PLEKHF1, MAPK8IP1, ID3
cell motion	3,5 x 10-13	FGF19, MTSS1, LYPD3, PTGS2, PDGFB, IL16, PLXNA2, GDF7, EFNA2, PEX5, PAX3, ACTG1, WNT1, DAB1, CD44, CTGF, ANK3, UNC5A, PLA2G1B, ROBO2, CEACAM1, EFNB1, IL6R, SLIT2, SLIT3, ARHGEF11, SMO, TNS3, TNS1, CELF3, IL12A, FOXC1, CNTN4, VCAN, EFNA5, MST1R, ACVR1, DNAH11, DNAH9, CCK, ENPP2, DNAH17, DNAH3, SPOCK1, DNAH2, KIT, DNAH8, CDH4, SCRIB, EPHB1, ALCAM, CD9, PVRL1, ROPN1B, TNR, ADRA2A, POU3F3, TNN, SCNN1G, SCNN1B, RUNX3, DCLK1, FN1, ACTB, B4GALT1, NFASC, TBX1, LMX1A, DBH, VAV2, COL5A1, KDR, LSP1, LAMA1, FEZF2, ITGA6, ETS1, FOXE1, BMPR1B, BMP7, LRP5, FEZ1
transcription	5,3 x 10-12	RORB, ZNF253, CITED4, ZNF251, ZFP92, ZNF778, ZNF777, CDCA7, MED27, CREB3L3, CRY1, PITX1, ZNF641, RXRG, MED10, ZNF37A, HES1, ZNF787, PRDM4, MED15, RFC1, BHLHA9, VGLL4, PIAS1, UNCX, ZNF519, ZNF133, CRTIC1, TAF9B, FIGLA, ZNF232, MYT1, PLAGL1, ZNF229, LHX8, TCF3, PLAG1, TCF7, ESRRG, KLF14, ZNF521, SMYD1, ZSCAN1, ETS1, ZNF213, HOPX, ZNF114, PARP1, ZNF219, GTF3A, BACH2, PPARG, SPI1, ZNF12, ZNF14, FOXS1, FOXB2, ZNF879, FOXB1, ZFAT, DEDD2, ZNF354A, ZNF354B, ZFP37, MXD4, ZNF334, FOXD4L1, MED9, FOXC2, FOXC1, USP22, ZNF33B, ZNF485, SCML4, ETV7, ZFP64, ZBTB9, ZNF75A, ZBTB16, ZNF175, POLR2A, ZNF30,

		<p>BCL11A, HSF2BP, ETV6, MLLT3, ZNF267, ZNF560, ZNF564, POLR3H, TBX3, TBX4, ZFP1, ZNF25, TBX1, LMX1A, SNAI2, ZNF22, ZNF23, RLF, SNAI3, FOXE1, ZNF763, PBX1, ZNF572, ZNF573, NR5A1, HMX2, JDP2, IL16, ARNT2, FOXO3, APOBEC3F, CBX7, CNOT4, IGHMBP2, ZNF181, GATA4, ZNF443, ATOH8, ATOH7, ZNF440, HES7, VAX2, HDAC11, ARID1B, HES6, GRHL1, POLR2J2, GRHL2, FOXN3, ELL2, HHEX, ZNF195, MNX1, TFAP2C, TSHZ3, ONECUT3, SOX5, TFEB, SOX6, ZNF846, RRAGC, NKX3-2, BTF3, ZNF426, RUNX3, ZNF423, BHLHE23, RFX4, GSX2, ARID3A, NR4A1, WHSC2, ESX1, FOXP4, ARID3C, FEZF2, EBF4, HABP4, HDAC9, BMI1, E2F7, PAX3, ZKSCAN3, PAX1, BARX1, LBH, PCGF3, BARX2, GTF2A1, PAX7, LRRFIP1, ALX1, SSBP3, FOXJ2, SOX14, ZNF92, SOX11, ESR1, LEF1, FOXJ3, CDC5L, HLTF, MCM4, MYT1L, HOXC13, ZNF711, ZFPM2, LCOR, C1D, ZBTB8B, NFYB, ERCC6, PRDM14, CDYL, HAND2, NFATC4, KDM3A, GFI1, NFATC2, INSM1, MAF, ERG, CEBPB, CEBPE, DTX1, CREB5, DACH1, PWP1, IRF5, HIF3A, IRF4, TBL1X, NFIA</p>
<p>regulation of RNA metabolic process</p>	<p>8,7 x 10⁻¹¹</p>	<p>RORB, ZNF253, ZNF251, ZFP92, ZNF778, ZNF777, MED27, TRAK1, PLA2G1B, CREB3L3, PITX3, PITX1, ZNF641, L3MBTL4, RAN, RXRG, MECOM, MED10, ZNF37A, HES1, PRDM7, RAB18, MED15, VEGFA, PIAS1, UNCX, ZNF519, ZNF133, CRTC1, TAF9B, ZNF232, MYT1, PLAGL1, ZNF229, MUSK, IL17F, LHX8, TCF3, NKX2-5, ARHGEF10L, BMP4, DNMT3A, BMP2, TCF7, ESRRG, ZSCAN1, DLX3, ETS1, ZNF213, DLX4, HOPX, ZNF114, BMP7, BMP6, KCNH1, BACH2, PPARG, SPI1, ZNF12, ZNF14, FOXS1, CCNE1, CREG1, FOXB2, NOBOX, ZNF879, FOXB1, GATAD1, SIK1, BATF2, ZNF354A, ZNF354B, JMY, ARHGEF11, ZFP37, MXD4, ZNF334, INHBA, FOXD4L1, MED9, KCNH7, FOXC2, FOXC1, KCNH8, ZNF33B, ZNF485, ETV7, ZNF75A, ZBTB16, ZNF175, POLR2A, ZNF30, ETV6, MLLT3, ZNF267, ZNF560, ZNF564, IL5, DGKQ, TBX3, TBX4, ZFP1, ZNF25, TBX1, LMX1A, SNAI2, ZNF23, SNAI3, MEOX1, FOXE1, ZNF763, PBX1, ZNF573, NR5A1, HMX2, JDP2, ARNT2, FOXO3, IL11, IL31RA, IGHMBP2, WNT1, ZNF181, GATA4, ZNF443, SATB1, ZNF440, SIX3, VAX2, HES7, ARID1B, HES6, PKIA, SIX6, FOXN3, HHEX, ZNF195, SMARCE1, CELF6, MNX1, CELF3, TFAP2C, TSHZ3, ONECUT3, SOX5, TFEB, SOX6, MAPKAPK2, LIN28A, ZNF846, DBX2, HNRNPF, NKX3-2, ZNF426, RUNX3, DBX1, RFX8, TESC, BHLHE23, RFX4,</p>

		GSX2, ARID3A, NR4A1, ESX1, FOXP4, EBF4, HDAC9, E2F7, PRRX1, PAX3, ZKSCAN3, PAX1, SKAP1, BARX1, BARX2, PAX7, PDE8B, LRRFIP1, ALX1, FOXJ2, SOX14, SOX11, ZNF92, OTX1, ESR1, LEF1, FOXJ3, MBNL1, CDC5L, HLTF, MYT1L, ADRB2, HOXC13, ZFPM2, LCOR, MAPRE3, CALCR, IRX3, NFYB, GRAMD4, DRGX, TNFRSF1B, ERCC6, HAND2, POU3F3, NFATC4, GFI1, NFATC2, MAF, ERG, CEBPB, CEBPE, CREB5, ID2, IRF5, HBZ, HIF3A, MAPK8IP1, ID3, IRF4, SCAND3, TBL1X, NFIA
neuron differentiation	1,4x 10 ⁻¹⁰	TUBB2B, EFNA1, GDF7, EFNA2, PEX5, RORB, PAX3, RTN1, EFHD1, WNT1, CD44, MCOLN3, ANK3, UNC5A, PAX7, ROBO2, PITX3, DSCAM, STMN2, EFNB1, MDGA2, STXBP1, VAX2, FGF20, SLIT2, THY1, SLIT3, AMIGO1, HES1, SMO, SLITRK1, SLITRK3, PSD, VEGFA, MNX1, CNTN4, VCAN, EFNA5, IGSF9, KALRN, CCK, CLU, SOX5, BRSK2, CDH4, EPHB1, ALCAM, LAMB2, PVRL1, TNFR, BAI1, PCSK9, TNN, GFI1, OLFM3, LHX8, NEFL, SNAP25, RUNX3, DCLK1, ACTB, BMP4, CEBPB, GSX2, RTN4R, NFASC, LMX1A, FEZF2, NTRK1, NTRK2, PHGDH, ID3, BMPR1B, BMP7, WNT7A, NTM, FEZ1
regulation of neurogenesis	9,9 x 10 ⁻⁷	IRX3, EFNA1, PPARG, SOX5, KIT, CDH4, TTL, TIAM1, MAPT, ROBO2, CDK5RAP2, NKX2-5, NEFL, BMP4, BMP2, ARHGEF1, PTPRF, DTX1, NLGN1, RTN4R, LIG4, LMX1A, SLIT2, THY1, AMIGO1, HES1, SMO, MIB1, NTRK2, PBX1, CNTN4, SEMA4D, BMP7, WNT7A, KALRN
positive regulation of cell differentiation	1x 10 ⁻⁶	IRX3, IL6ST, CLU, PPARG, FOXO3, KIT, CDH4, CCNE1, AGTR1, TIAM1, MAPT, ROBO2, GFI1, INPP5D, NRG1, NEFL, NKX2-5, BMP4, LPL, BMP2, TESC, IL5, ARHGEF1, PTPRF, ADAMTS20, LIG4, IL6R, SLIT2, AMIGO1, INHBA, SMO, CD83, ID2, ETS1, HOPX, GNAS, SEMA4D, BMPR1B, BMP7, BMP6, ACVR1
DNA binding	1,2 x 10 ⁻⁶	HMGN1, RORB, ZNF253, ZNF251, ZFP92, ZNF778, ZNF777, DDX11, TIGD2, TIGD4, CREB3L3, CRY1, PITX3, PITX1, ZNF641, L3MBTL4, RXRG, LIG4, MECOM, TOX3, ZNF37A, HES1, ZNF787, PRDM4, RFC1, BHLHA9, PIAS1, UNCX, ZNF519, KIF4B, ZNF133, TAF9B, FIGLA, ZNF232, MYT1, ZNF229, PLAGL1, LHX8, TCF3, NKX2-5, PLAG1, DNMT3A, TCF7, ESRRG, KLF14, ZNF521, SMYD1, ZSCAN1, DLX3, ETS1, ZNF213, DLX4, HOPX, ZNF114, PARP1, ZNF219, BTBD11, GTF3A, BACH2, ZMAT4,

		<p>PPARG, SPI1, ZNF12, ZNF14, FOXS1, FOXB2, NOBOX, FOXB1, ZFAT, HIST3H2BB, GATAD1, DEDD2, BATF2, ZNF354A, ZNF354B, PAPD7, PAPD5, ZFP37, MXD4, ZNF334, FOXD4L1, FOXC2, FOXC1, KCNH8, ZNF33B, THOC1, ZNF485, TOP3B, SCML4, ETV7, ZFP64, ABTB2, ZBTB9, ZNF75A, ZBTB16, ZNF175, POLR2A, ZNF30, GIN1, ETV6, ZNF267, ZNF560, ZNF564, TBX3, TBX4, ZFP1, ZNF25, TBX1, LMX1A, SNAI2, TRIM21, MSRB2, ZNF22, ZNF23, RLF, SNAI3, MEOX1, FOXE1, ZNF763, PBX1, ZNF572, ZNF573, NR5A1, HMX2, JDP2, LMO2, ARNT2, INO80, FOXO3, IGHMBP2, ZNF181, GATA4, ZNF443, ATOH8, ATOH7, RDM1, SATB1, ZNF440, SIX3, VAX2, TOPBP1, HES7, ARID1B, HES6, GRHL1, POLR2J2, SIX6, GRHL2, FOXN3, HHEX, ZNF195, SMARCE1, MNX1, TFAP2C, TNFAIP3, TSHZ3, ONECUT3, SOX5, TFEB, SOX6, CXXC5, LIN28A, ZNF846, DBX2, POLE4, NKX3-2, ZNF426, DBX1, RUNX3, ZNF423, RFX8, BHLHE23, RFX4, GSX2, ARID3A, NR4A1, TSN, ESX1, FOXP4, ARID3C, FEZF2, EBF4, ZIC5, NYNRIN, E2F7, PRRX1, PAX3, ZKSCAN3, PAX1, PDCD2, BARX1, BARX2, GTF2A1, PAX7, LRRFIP1, LBR, TERT, ALX1, SSBP3, REV1, FOXJ2, SOX14, SOX11, ZNF92, OTX1, ESR1, LEF1, FOXJ3, CDC5L, HLTF, MCM4, MYT1L, HOXC13, ZNF711, ZFPM2, LCOR, C1D, IRX3, ZBTB8B, NFYB, RAG2, GRAMD4, DRGX, RPA1, ERCC6, PRDM14, CHD1L, CENPA, HAND2, POU3F3, NFATC4, GFI1, NFATC2, BAHD1, INSM1, MAF, ERG, CEBPB, CEBPE, CREB5, DACH1, IRF5, ZBED4, HIF3A, ZRANB3, IRF4, SCAND3, TBL1X, NFIA</p>
Transcription factor binding	7,5x 10 ⁻⁶	<p>ARNT2, PPARG, PRRX1, CITED4, IL31RA, IGHMBP2, CCNE1, GTF2A1, GATA4, CREG1, GPX3, MED27, NRG1, ALX1, PRAME, RAN, PCBD1, ACTN2, ARID1B, HDAC11, HES6, MXD4, JMY, HHEX, RAB18, SMARCE1, ZFPM2, FOXC1, USP22, PIAS1, LCOR, C1D, ENPP2, ZBTB9, CRTIC1, TAF9B, FIGLA, HAND2, BCL11A, NFATC4, NKX2-5, TCF3, DTX1, TP53BP2, SMYD1, ETS1, PBX1, ID3, IRF4, HDAC9, PARP1, TBL1X, NFIA, NR5A1</p>
positive regulation of cytoskeleton organization	3,3 x 10 ⁻³	<p>CAV3, P2RX7, KISS1R, PLEK, MAPT, MTOR, RICTOR, ARHGEF10L, CDC42EP5, SYNPO</p>

H3K4me3 in GSC to H3K27me3 in GSC-miR-302-367 (Figure 11A)		
Termes GO	P-value	Nom des gènes
response to oxidative stress	1.7 x 10 ⁻⁶	GPX3, PXDNL
DNA bending activity	1.7 x 10 ⁻⁶	LEF1
protein dimerization activity	7.1 x 10 ⁻⁶	ACPR1B, ARNT2, BEGAIN, DPP4, HP, LHCGR, MAT1A, NUP210, PM20D1, PTPRE, SEPT5
regulation of neuronal differentiation	2.2 x 10 ⁻⁵	IRX3
response to hypoxia	4.5 x 10 ⁻⁵	ARNT2, DPP4, HP, SDC2
Wnt receptor signaling pathway	7.0 x 10 ⁻⁴	LEF1, SFRP4
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	3.0 x 10 ⁻³	ARHGEF10L, ARNT2, IRX3, LEF1, PLP1, RFX4
DNA replication	5.2 x 10 ⁻³	LEF1
tissue regeneration	6.9 x 10 ⁻³	TEC, TIMP3
forebrain development	8.9 x 10 ⁻³	LEF1, RFX4

H3K27me3 in GSC to H3K4me3 in GSCmiR (Figure 11B)		
Termes GO	P-value	Nom des gènes
interferon-gamma production	4.6 x 10 ⁻¹⁵	AVPR2, IL12RB2
synaptic transmission	4.0 x 10 ⁻¹⁴	ACHE, GABRA2, GRIA2, GRM2, MUSK, RPH3A, SNAP25, THBS2
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	2 x 10 ⁻¹²	AVPR2, GABRA2, GABRA4, GRM2, LPAR1, KNG1, OR4K1, OR51B5, PTH2R, PKHD1L1
receptor metabolic process	1.4 x 10 ⁻¹⁰	ACHE, GRIA2, MUSK
regulation of synapse structure and activity	5.6 x 10 ⁻⁸	ACHE, MUSK, SNAP25, THBS2
protein kinase cascade	1x 10 ⁻⁶	WNT5A, PRKAG3, NDST1, ADORA2B, EFNA1, TBK1, IL6ST, MAPKAPK2, LATS2, IL31RA, PRKACG, MAP3K9, PLA2G1B, ADRA2A, ADRA2B, NOS2, SIK1, TNIP2, DGKQ, MAP2K4, P2RX7, PLCE1, DUSP2, RPS6KA2, PIAS1
protein amino acid phosphorylation	2.8 x 10 ⁻⁵	FYB, IL12RB1, IL12RB2, LPAR1, MOS, MUSK, *PTK6*
activation of caspase activity	7.3 x 10 ⁻⁵	NLRP3, AIFM3
neuron differentiation	1,4x 10 ⁻⁴	GDF7, EFNA1, CLU, RORB, RTN1, ALCAM, WNT1, PVRL1, CD44, TNN, GFI1, PITX3, ACTB, GSX2, EFNB1, RTN4R, VAX2, FGF20, HES1, SLITRK1, SMO, PSD, NTRK1, VEGFA, MNX1, PHGDH, EFNA5, IGSF9, FEZ1, KALRN
cell-cell signaling	1,6x 10 ⁻⁴	WNT5A, PPFIA3, SCN1B, EFNA1, GRIK2, CGB7, CACNB4, HRH1, GRIN2B, PVRL1, CCL21, ADRA2B, WNT8B, GLRB, ALDH5A1, EFNB1, NLGN1, FGF20, GJB2, SMO, P2RX7, TNFSF10, SSTR3, STC1, EFNA5, CACNA1E, TSHR
cellular homeostasis	1.5 x 10 ⁻³	AIFM3, ATP7B, C7, CD55, KNG1, LPAR1
cell motion	2 x 10 ⁻³	GDF7, PLXNA2, DNAH2, ALCAM, WNT1, PVRL1, CD44, ROPN1B, CTGF, ADRA2A, PLA2G1B, POU3F3, TNN, FN1, ACTB, EFNB1, IL6R, VAV2,

		ARHGEF11, SMO, ITGA6, IL12A, EFNA5, FOXC1, FEZ1, LRP5
cell-cell adhesion	3.5 x 10 ⁻³	ALX1, CEACAM1, PCDHA1, PCDHGA1
positive regulation of gene expression	4.9 x 10 ⁻³	ALX1, AVPR2, FOXE1, INHBA, NOBOX
embryonic organ development	9.0 x 10 ⁻³	ALX1, FOXE1, OTOP1

Bivalent in GSC to H3K27me3 in GSCmiR (Figure Supplémentaire 2A)		
Termes GO	P-value	Nom des gènes
neuropeptide signaling pathway	1.3 x 10 ⁻⁴	BAI1,CRHR1,ECEL1,GPR116,OPRD1,PROK2,SORCS2
cation transport	4.1 x 10 ⁻⁴	ABCC8,ANXA6,ATP10A,ATP11A,ATP8A2,ATP8B4,CACNA1D,CAMK2B,JPH2,KCNK5,KCNS3,NIPAL1,NKX2-5,OPRD1,PLCG2,PRKAG2,RYR3,SCN5A,SCNN1G,SLC9A3,TESC,THY1,TRPC4,TRPM1
axon guidance	9.4 x 10 ⁻⁴	BMP7,CACNA1D,CDH4,CNTN1,COL5A1,COL6A1,DSCAM,EPHB1,FEZF2,FOXD4L1,LAMA1,LMX1A,MYH11,MYH14,SLIT3,TRPC4,UNC5A
Wnt receptor signaling pathway	1.5 x 10 ⁻³	BARX1,BICC1,BMP2,FAM123A,FAM123C,NKD1,NKD2,NKX2-5,PLCG2,ROR2,SFRP1,WNT7A,WNT9B
positive regulation of synapse assembly	1.5 x 10 ⁻³	EPHB1, LRRC4B, WNT7A
somatic stem cell maintenance	1.9 x 10 ⁻³	BMP7, SFRP1, TFAP2C, WNT7A
cell-cell signaling	2.2 x 10 ⁻³	ABCC8,ADCY2,ADRA1B,AVPR1A,BARX1,BMP2,CACNA1D,CAMK2B,CHRM1,CRHR1,CXCL14,DBH,EPHB1,INHBB,KCNS3,LRRC4B,NEFL,O3FAR1,PDE8B,PRIMA1,PRKCB,SFRP1,SNC AIP,SOX11,SSTR2,STC2,SYN2,SYN3,TBX3,TFAP2C,TNC,TNFSF9,VIPR1,WNT7A,WNT9B
negative regulation of canonical Wnt receptor signaling pathway	4.5 x 10 ⁻³	BICC1, FAM123A, NKX2-5, ROR2, SFRP1
epithelial cell differentiation	4.6 x 10 ⁻³	BARX1,BMP7,CRHR1,FOXC2,LAMA1,MTSS1,PROM1,SCEL,TBX1,TBX3,TFAP2C,WNT7A,WNT9B
cellular response to hypoxia	8.3 x 10 ⁻³	BMP7, PTGIS, SFRP1, STC2
cell adhesion	8.8 x 10 ⁻³	BAI1,BARX2,BMP7,CADM3,CD96,CDH22,CDH4,CDHR1,CNTN1,COL5A1,COL6A1,DSCAM,EPHB1,FOXC2,LAMA1,LAMC3,MTSS1,NTM,PLEKHA7,ROR2,SFRP1,SIRPA,SNED1,TESC,THY1,TNC,UNCX
adult behavior	9 x 10 ⁻³	ADRA1B, BRS3, DBH, OPRD1
G-protein coupled receptor signaling pathway	9.1 x 10 ⁻³	ADCY2,ADRA1B,AVPR1A,BAI1,BRS3,CAMK2B,CHRM1,CRHR1,DGKK,ECEL1,GPR116,GPR39,OPRD1,OXGR1,PIK3R6,PREX2,PROK2,RGR,RGS7BP,SORCS2,SSTR2,VIPR1

Bivalent in GSC to H3K4me3 in GSCmiR (Figure Supplémentaire 2B)		
Termes GO	P-value	Nom des gènes
response to fatty acid	2.6 x 10 ⁻⁴	CPS1,GIPR,GNPAT,HSD17B3,INSIG2,PDGFB
cellular nitrogen compound metabolic process	1 x 10 ⁻³	ACADL,ACER2,ACVR1,ADAP1,ALDOB,ARG2,ARL4C,ASNS,ATP13A4,ATP8B3,BAHD1,BICD1,BMP4,C1D,CAP2,CBX7,CCNE1,CDC7,CDS1,CDYL,CEBPB,CEBPE,CELF6,CENPA,CITED4,CNOT10,COMMD6,CPS1,CRY1,CSNK2A2,CXCL13,DACH1,DDX11,DEDD2,DGKI,DIO2,DKK3,EIF5,ELMOD2,ENPP2,ENTPD8,ERCC6,ESR1,ESX1,ETS1,ETV7,FAH,FHIT,FIGLA,FOXJ2,FOXJ3,FOXO3,FZD8,GCFC2,GFM1,GHR,GIN1,GIPR,GLUD1,GMNC,GNAS,GPT2,GRM8,GUCY1A3,GUK1,HDAC9,HES7,HHEX,HIF3A,HITF,HNRNPF,HOXC13,ID3,IKBKB,IL11,INO80,INO80C,INSIG2,IRF4,ISG20,IYD,KCNH1,KCNH7,KDM3A,KPNA2,KYNU,LANCL2,LIDHB,LIG4,LMO2,LRIF1,MACROD2,MAPK8IP1,MCM4,MECOM,MED10,MLLT3,MME,MOCS1,MTHFD2L,MTR,NAF1,NAMPT,NFATC4,NFIA,NFYB,NGEF,NOM1,NUDT7,ORC5,PANK3,PAX3,PCGF3,PDGFB,PHF2,PINX1,PNPLA6,POLR2A,POLR3H,POP4,PPARG,PRDM14,PRDM4,PREX1,PRKCH,PRPF18,PRPS2,PSMA1,PSMC1,PTGS2,PTX3,PWP1,RAB18,RAG2,RAMP2,REV1,RFC1,RFX8,RGS7,RHOJ,RICTOR,RIT2,RLF,RNASEH2C,RNGTT,RP1A1,RPF1,RPIA,RPP21,RUNX3,SAT1,SATB1,SCML4,SCRIB,SGK1,SKAP1,SKOR1,SLC23A2,SLC25A10,SLC25A39,SLC28A2,SMARCE1,SNAI2,SNAI3,SOX5,SPI1,SPR,SPTA1,SQRDL,SRSF6,STRAP,SYCE3,TAF9B,TAT,TBC1D15,TBL1X,TCF3,TERT,TFEB,THOC1,TNFAIP3,TPBP1,TPK1,TRAF3,TRAK1,TSC1,TSN,TTN,TYW1B,UBE2V2,URI1,USP10,UTP20,WDR61,WHSC2,WNT4,YARS2,ZBTB16,ZBTB8B,ZBTB9,ZFAT,ZNF114,ZNF133,ZNF14,ZNF175,ZNF22,ZNF23,ZNF232,ZNF25,ZNF253,ZNF30,ZNF334,ZNF33B,ZNF37A,ZNF485,ZNF560,ZNF641,ZNF711,ZNF778,ZNF846,ZNF879,ZSCAN1
regulation of endothelial cell apoptotic process	1.9 x 10 ⁻³	KDR, RAMP2,TEK,TNFAIP3
positive regulation of fat cell differentiation	2.7 x 10 ⁻³	PPARG,PTGS2,SNAI2,WIF1,ZBTB16
ureteric bud development	3.2 x 10 ⁻³	ARG2,BMP4,CALB1,CRLF1,GPC3,NPNT,ROBO2,SLIT2,WNT4
carboxylic acid	3.4 x 10 ⁻³	ACE,ARG2,KISS1R,PPARG,SLC19A1,SLC22A5,SLC23A2,SLC2

transport		5A1,SLC25A10,SLCO1B1
phosphatidylinositol biosynthetic process	4.1 x 10 ⁻³	CD81,CDS1,INPP4B,MPPE1,PDGFB,PIGG,PIK3C2G
positive regulation of osteoblast differentiation	6 x 10 ⁻³	ACVR1,BMP4,BMPR1B,CEBPB,GNAS,NPNT,WNT4
organ development	6.7 x 10 ⁻³	ACE,ACVR1,AGPAT2,AGTR1,ALDOB,AQP3,ARG2,ASNS,B4GAL1,BFSP2,BMP4,BMPR1B,CA4,CACNB2,CALB1,CCNE1,CD9,CEBPB,CEBPE,CNTN4,COL13A1,COL4A4,COL8A1,CPE,CPS1,CXCL13,DKK3,DYRK3,ESR1,ESX1,ETS1,ETV7,FGF12,FOXJ2,FOXJ3,FOXO3,FXR1,FZD8,GHR,GHSR,GIP,GIPR,GJB3,GNAS,GNPAT,HAP1,HCN2,HDAC9,HHEX,HNMT,HOXC13,HPS1,HPS1E,HSD17B3,ID3,IL11,INSIG2,IRF4,JPH1,KCNH1,KDR,LAMB2,LIG4,LMO2,LPHN1,LSR,MAGI2,MCOLN3,MECOM,MIB1,MLLT3,MMME,NOX3,PAM,PAX3,PDGFB,PHF2,PIP4K2A,PNPLA6,PPARG,PRKCH,PTGS2,RAB18,RAG2,RAMP2,RBM24,ROBO2,RPA1,RASAD2,RXFP1,SCRIB,SIX3,SIX6,SLC9A3R2,SLIT2,SNAI2,SOX5,SPI1,SPTA1,TCF3,TEK,TFEB,TNFAIP3,TNS3,TSC1,TSPAN12,TTN,USH2A,VCAN,WDR61,WNT10A,WNT4,ZBTB16,ZNF22
negative regulation of steroid biosynthetic process	7.7 x 10 ⁻³	DKK3, INSIG2, SNAI2, WNT4
regulation of cell growth	7.9 x 10 ⁻³	ABTB2,AGTR1,CDHR2,CISH,INO80,PPARG,PRDM4,SGK1,SLIT2,SOCS2,SPOCK1,TAF9B,TTL,URI1,WISP2
brown fat cell differentiation	9.5 x 10 ⁻³	CEBPB, NUDT7, PPARG, PTGS2

H3K4me3 in GSC to H3K27me3 in GSCmiR (Figure Supplémentaire 2C)		
Termes GO	P-value	Nom des gènes
hydrogen peroxide catabolic process	1 x 10 ⁻⁴	GPX3, HP, PXDNL
central nervous system development	1.9 x 10 ⁻³	ARNT2, LEF1, LHCGR, MAL, PLP1, SFRP4, TIMP3
myelination	2.4 x 10 ⁻³	MAL, NFASC, PLP1, TG
inorganic anion transport	2.9 x 10 ⁻³	APOL1, SFRP4, TG
establishment of localization	6.3 x 10 ⁻³	ABCA12,APOL1,ATCAY,ATP9A,AVPR1B,DAPK1,DPP4,LHCGR,NUP210,SEPT5,SFRP4,SIGLEC1,TG
cell adhesion	8.3 x 10 ⁻³	CASS4, COL6A2, CXCR7, DPP4, FBLN7, LEF1, NFASC, PARVB, SIGLEC1
mesoderm development	9.2 x 10 ⁻³	IRX3, LEF1, TIE1

H3K27me3 in GSC to H3K4me3 in GSCmiR (Figure Supplémentaire 2D)		
Termes GO	P-value	Nom des gènes
glutamate secretion	3.8 x 10 ⁻⁴	GLS2, GRM2, SNAP25
gamma-aminobutyric acid signaling pathway	1.7 x 10 ⁻³	GABRA2, GABRA4
regulation of synapse assembly	2 x 10 ⁻³	MUSK, SNAP25, THBS2
complement activation, classical pathway	3.4 x 10 ⁻³	C7, CD55
positive regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	5 x 10 ⁻³	BMP5, INHBA
positive regulation of interferon-gamma production	8.3 x 10 ⁻³	IL12RB1, IL12RB2
ionotropic glutamate receptor complex	6.4 x 10 ⁻³	GRIA2, GRIN3B
extracellular ligand-gated ion channel activity	1.7 x 10 ⁻³	GABRA2, GABRA4, GRIA2, GRIN3B
neurotransmitter receptor activity	2.4 x 10 ⁻³	GABRA2, GABRA4, GRIN3B
GABA receptor activity	2.7 x 10 ⁻³	GABRA2, GABRA4
neurotransmitter binding	5.4 x 10 ⁻³	ACHE, GRIN3B
beta-amyloid binding	7.4 x 10 ⁻³	ACHE, FBXO2

BIBLIOGRAPHIE

Abraham BJ, Cui K, Tang Q, Zhao K. Dynamic regulation of epigenomic landscapes during hematopoiesis. *BMC Genomics*. 2013 Mar 19;14:193. doi: 10.1186/1471-2164-14-193. PubMed PMID: 23510235; PubMed Central PMCID: PMC3636055.

Abrey LE, Moskowitz CH, Mason WP, Crump M, Stewart D, Forsyth P, Paleologos N, Correa DD, Anderson ND, Caron D, Zelenetz A, Nimer SD, DeAngelis LM. Intensive methotrexate and cytarabine followed by high-dose chemotherapy with autologous stem-cell rescue in patients with newly diagnosed primary CNS lymphoma: an intent-to-treat analysis. *J Clin Oncol*. 2003 Nov 15;21(22):4151-6. PubMed PMID: 14615443.

Agger K, Cloos PA, Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J, Issaeva I, Canaani E, Salcini AE, Helin K. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature*. 2007 Oct 11;449(7163):731-4. Epub 2007 Aug 22. PubMed PMID: 17713478.

Akkers RC, van Heeringen SJ, Jacobi UG, Janssen-Megens EM, François KJ, Stunnenberg HG, Veenstra GJ. A hierarchy of H3K4me3 and H3K27me3 acquisition in spatial gene regulation in *Xenopus* embryos. *Dev Cell*. 2009 Sep;17(3):425-34. doi: 10.1016/j.devcel.2009.08.005. PubMed PMID: 19758566; PubMed Central PMCID: PMC2746918.

Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, Jackson EL, Li Y, Burns DK, Alvarez-Buylla A, Parada LF. Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell*. 2009 Jan 6;15(1):45-56. doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.006. Erratum in: *Cancer Cell*. 2009 Mar 3;15(3):240. PubMed PMID: 19111880; PubMed Central PMCID: PMC2650425.

Alder O, Laval F, Helness A, Brookes E, Pinho S, Chandrashekran A, Arnaud P, Pombo A, O'Neill L, Azuara V. Ring1B and Suv39h1 delineate distinct chromatin states at bivalent genes during early mouse lineage commitment. *Development*. 2010 Aug 1;137(15):2483-92. doi: 10.1242/dev.048363. Epub 2010 Jun 23. PubMed PMID: 20573702; PubMed Central PMCID: PMC2927698.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3983-8. Epub 2003 Mar 10. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 27;100(11):6890. PubMed PMID: 12629218; PubMed Central PMCID: PMC153034.

Allfrey VG, Mirsky AE. Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science*. 1964 May 1;144(3618):559. PubMed PMID: 17836360.

Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Apr 13;11(5):384-400. doi: 10.1038/nrd3674. Review. PubMed PMID: 22498752.

Ashoor H, Héroult A, Kamoun A, Radvanyi F, Bajic VB, Barillot E, Boeva V. HMCAN: a method for detecting chromatin modifications in cancer samples using ChIP-seq data. *Bioinformatics*. 2013 Oct 3. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24021381.

Auclair G, Weber M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. *Biochimie*. 2012 Nov;94(11):2202-11. doi: 10.1016/j.biochi.2012.05.016. Epub 2012 May 23. Review. PubMed PMID: 22634371.

Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jørgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merckenschlager M, Fisher AG. Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol*. 2006 May;8(5):532-8. Epub 2006 Mar 29. PubMed PMID: 16570078.

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007 May 18;129(4):823-37. PubMed PMID: 17512414.

Bax DA, Little SE, Gaspar N, Perryman L, Marshall L, Viana-Pereira M, Jones TA, Williams RD, Grigoriadis A, Vassal G, Workman P, Sheer D, Reis RM, Pearson AD, Hargrave D, Jones C. Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development. *PLoS One*. 2009;4(4):e5209. doi: 10.1371/journal.pone.0005209. Epub 2009 Apr 14. PubMed PMID: 19365568; PubMed Central PMCID: PMC2666263.

Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY. Primary brain tumours in adults. *Lancet*. 2003 Jan 25;361(9354):323-31. Review. PubMed PMID: 12559880.

Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet.* 2008 May;40(5):499-507. doi: 10.1038/ng.127. PubMed PMID: 18443585; PubMed Central PMCID: PMC2912221.

Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell.* 2006 Apr 21;125(2):315-26. PubMed PMID: 16630819.

Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):669-81. Review. PubMed PMID: 17320505.

Bienz M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sci.* 2006 Jan;31(1):35-40. Epub 2005 Nov 16. Review. PubMed PMID: 16297627.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002 Jan 1;16(1):6-21. Review. PubMed PMID: 11782440.

Black JC, Whetstone JR. Tipping the lysine methylation balance in disease. *Biopolymers.* 2013 Feb;99(2):127-35. doi: 10.1002/bip.22136. PubMed PMID: 23175387.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997 Jul;3(7):730-7. PubMed PMID: 9212098.

Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 2006 May 18;441(7091):349-53. Epub 2006 Apr 19. PubMed PMID: 16625203.

Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2010 Jan 29;17(1):F19-36. doi: 10.1677/ERC-09-0184. Print 2010 Mar. Review. PubMed PMID: 19779035.

Brat DJ, Prayson RA, Ryken TC, Olson JJ. Diagnosis of malignant glioma: role of neuropathology. *J Neurooncol*. 2008 Sep;89(3):287-311. doi: 10.1007/s11060-008-9618-1. Epub 2008 Aug 20. PubMed PMID: 18712282.

Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D, Ozawa T, Tandon A, Pedraza A, Holland E. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One*. 2009 Nov 13;4(11):e7752. doi: 10.1371/journal.pone.0007752. PubMed PMID: 19915670; PubMed Central PMCID: PMC2771920.

Briggs SD, Bryk M, Strahl BD, Cheung WL, Davie JK, Dent SY, Winston F, Allis CD. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 2001 Dec 15;15(24):3286-95. PubMed PMID: 11751634; PubMed Central PMCID: PMC312847.

Broniscer A, Gajjar A. Supratentorial high-grade astrocytoma and diffuse brainstem glioma: two challenges for the pediatric oncologist. *Oncologist*. 2004;9(2):197-206. Review. PubMed PMID: 15047924.

Broniscer A, Baker SJ, West AN, Fraser MM, Proko E, Kocak M, Dalton J, Zambetti GP, Ellison DW, Kun LE, Gajjar A, Gilbertson RJ, Fuller CE. Clinical and molecular characteristics of malignant transformation of low-grade glioma in children. *J Clin Oncol*. 2007 Feb 20;25(6):682-9. PubMed PMID: 17308273.

Brookes E, de Santiago I, Hebenstreit D, Morris KJ, Carroll T, Xie SQ, Stock JK, Heidemann M, Eick D, Nozaki N, Kimura H, Ragoussis J, Teichmann SA, Pombo A. Polycomb associates genome-wide with a specific RNA polymerase II variant, and regulates metabolic genes in ESCs. *Cell Stem Cell*. 2012 Feb 3;10(2):157-70. doi: 10.1016/j.stem.2011.12.017. PubMed PMID: 22305566; PubMed Central PMCID: PMC3682187.

Brownell JE, Allis CD. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev*. 1996 Apr;6(2):176-84. Review. PubMed PMID: 8722174.

Brunk BP, Martin EC, Adler PN. Drosophila genes Posterior Sex Combs and Suppressor two of zeste encode proteins with homology to the murine bmi-1 oncogene. *Nature*. 1991 Sep 26;353(6342):351-3. PubMed PMID: 1833647.

Cannon-Carlson SV, Gokhale H, Teebor GW. Purification and characterization of 5-hydroxymethyluracil-DNA glycosylase from calf thymus. Its possible role in the maintenance of methylated cytosine residues. *J Biol Chem*. 1989 Aug 5;264(22):13306-12. PubMed PMID: 2473989.

Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*. 2002 Nov 1;298(5595):1039-43. Epub 2002 Sep 26. PubMed PMID: 12351676.

Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell*. 2004 Jul 2;15(1):57-67. PubMed PMID: 15225548.

Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):6029-33. PubMed PMID: 16024602.

Chapman-Rothe N, Curry E, Zeller C, Liber D, Stronach E, Gabra H, Ghaem-Maghami S, Brown R. Chromatin H3K27me3/H3K4me3 histone marks define gene sets in high-grade serous ovarian cancer that distinguish malignant, tumour-sustaining and chemo-resistant ovarian tumour cells. *Oncogene*. 2012 Nov 5. doi: 10.1038/onc.2012.477. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23128397.

Chow LM, Endersby R, Zhu X, Rankin S, Qu C, Zhang J, Broniscer A, Ellison DW, Baker SJ. Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb pathways induces high-grade astrocytoma in adult brain. *Cancer Cell*. 2011 Mar 8;19(3):305-16. doi: 10.1016/j.ccr.2011.01.039. PubMed PMID: 21397855; PubMed Central PMCID: PMC3060664.

Christensen J, Agger K, Cloos PA, Pasini D, Rose S, Sennels L, Rappsilber J, Hansen KH, Salcini AE, Helin K. RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell*. 2007 Mar 23;128(6):1063-76. Epub 2007 Feb 22. PubMed PMID: 17320161.

Ciccone DN, Su H, Hevi S, Gay F, Lei H, Bajko J, Xu G, Li E, Chen T. KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature*. 2009 Sep 17;461(7262):415-8. doi: 10.1038/nature08315. Epub 2009 Sep 2. PubMed PMID: 19727073.

Clausell J, Happel N, Hale TK, Doenecke D, Beato M. Histone H1 subtypes differentially modulate chromatin condensation without preventing ATP-dependent remodeling by SWI/SNF or NURF. *PLoS One*. 2009 Oct 1;4(10):e0007243. doi: 10.1371/journal.pone.0007243. PubMed PMID: 19794910; PubMed Central PMCID: PMC2748705.

Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol*. 2007 Nov;114(5):443-58. Epub 2007 Sep 6. Review. PubMed PMID: 17805551; PubMed Central PMCID: PMC2039798.

Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006 Nov 3;127(3):469-80. Review. PubMed PMID: 17081971.

Cui K, Zang C, Roh TY, Schones DE, Childs RW, Peng W, Zhao K. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell*. 2009 Jan 9;4(1):80-93. doi: 10.1016/j.stem.2008.11.011. PubMed PMID: 19128795; PubMed Central PMCID: PMC2785912.

Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V. *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell*. 2002 Oct 18;111(2):185-96. PubMed PMID: 12408863.

Dasgupta B, Li W, Perry A, Gutmann DH. Glioma formation in neurofibromatosis 1 reflects preferential activation of K-RAS in astrocytes. *Cancer Res*. 2005 Jan 1;65(1):236-45. PubMed PMID: 15665300.

Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P, Fallet-Bianco C. [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann Pathol*. 2000 Oct;20(5):413-28. Review. French. PubMed PMID: 11084409.

Deal RB, Henikoff JG, Henikoff S. Genome-wide kinetics of nucleosome turnover determined by metabolic labeling of histones. *Science*. 2010 May 28;328(5982):1161-4. doi: 10.1126/science.1186777. PubMed PMID: 20508129; PubMed Central PMCID: PMC2879085.

Deltour S, Chopin V, Leprince D. [Epigenetics and cancer]. *Med Sci (Paris)*. 2005 Apr;21(4):405-11. Review. French. PubMed PMID: 15811306.(mis par SS)

De Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M, Koseki H, Brockdorff N. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell*. 2004 Nov;7(5):663-76. PubMed PMID: 15525528.

De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G, Natoli G. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell*. 2007 Sep 21;130(6):1083-94. Epub 2007 Sep 6. PubMed PMID: 17825402.

Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol*. 2012 Nov;14 Suppl 5:v1-49. doi: 10.1093/neuonc/nos218. Review. Erratum in: *Neuro Oncol*. 2013 May;15(5):646-7. PubMed PMID: 23095881; PubMed Central PMCID: PMC3480240.

Dougherty EJ, Pollenz RS. Analysis of Ah receptor-ARNT and Ah receptor-ARNT2 complexes in vitro and in cell culture. *Toxicol Sci*. 2008 May;103(1):191-206. Epub 2007 Dec 20. PubMed PMID: 18096572; PubMed Central PMCID: PMC2396590.

Catherine Dupont, D. Randall Armant, Carol A. Brenner. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective *Semin Reprod Med*. Author manuscript; available in PMC 2009 December 10. Published in final edited form as: *Semin Reprod Med*. 2009 September; 27(5): 351–357. Published online 2009 August 26. doi: 10.1055/s-0029-1237423 PMCID: PMC2791696

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005 Dec 1;65(23):10946-51. PubMed PMID: 16322242.

Eissenberg JC, Shilatifard A. Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Dev Biol.* 2010 Mar 15;339(2):240-9. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.08.017. Epub 2009 Aug 21. Review. PubMed PMID: 19703438; PubMed Central PMCID: PMC3711867.

Endoh M, Endo TA, Endoh T, Isono K, Sharif J, Ohara O, Toyoda T, Ito T, Eskeland R, Bickmore WA, Vidal M, Bernstein BE, Koseki H. Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. *PLoS Genet.* 2012;8(7):e1002774. doi: 10.1371/journal.pgen.1002774. Epub 2012 Jul 26. PubMed PMID: 22844243; PubMed Central PMCID: PMC3405999.

Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008 Mar;15(3):504-14. Epub 2007 Nov 30. PubMed PMID: 18049477.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000 Nov 9;343(19):1350-4. Erratum in: *N Engl J Med* 2000 Dec 7;343(23):1740. PubMed PMID: 11070098.

Fan QW, Weiss WA. Targeting the RTK-PI3K-mTOR axis in malignant glioma: overcoming resistance. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;347:279-96. doi: 10.1007/82_2010_67. Review. PubMed PMID: 20535652; PubMed Central PMCID: PMC3012004.

Fareh M, Turchi L, Virolle V, Debryne D, Almairac F, de-la-Forest Divonne S, Paquis P, Preynat-Seauve O, Krause KH, Chneiweiss H, Virolle T. The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. *Cell Death Differ.* 2012 Feb;19(2):232-44. doi: 10.1038/cdd.2011.89. Epub 2011 Jul 1. PubMed PMID: 21720384; PubMed Central PMCID: PMC3263498.

Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature.* 2003 Jan 23;421(6921):448-53. Review. PubMed PMID: 12540921.

Figuroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez HF, Tallman MS, Sun Z, Wolniak K, Peeters JK, Liu W, Choe SE, Fantin VR, Paietta E,

Löwenberg B, Licht JD, Godley LA, Delwel R, Valk PJ, Thompson CB, Levine RL, Melnick A. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010 Dec 14;18(6):553-67. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.015. Epub 2010 Dec 9. PubMed PMID: 21130701.

Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev*. 2003 Aug 1;17(15):1870-81. PubMed PMID: 12897054; PubMed Central PMCID: PMC196235.

Formenti F, Constantin-Teodosiu D, Emmanuel Y, Cheeseman J, Dorrington KL, Edwards LM, Humphreys SM, Lappin TR, McMullin MF, McNamara CJ, Mills W, Murphy JA, O'Connor DF, Percy MJ, Ratcliffe PJ, Smith TG, Treacy M, Frayn KN, Greenhaff PL, Karpe F, Clarke K, Robbins PA. Regulation of human metabolism by hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 13;107(28):12722-7. doi: 10.1073/pnas.1002339107. Epub 2010 Jun 28. PubMed PMID: 20616028; PubMed Central PMCID: PMC2906567.

Francis NJ, Kingston RE, Woodcock CL. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science*. 2004 Nov 26;306(5701):1574-7. PubMed PMID: 15567868.

Freeburg PB, Abrahamson DR. Divergent expression patterns for hypoxia-inducible factor-1beta and aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter-2 in developing kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Oct;15(10):2569-78. PubMed PMID: 15466261.

Frenel JS, Botti M, Loussouarn D, Campone M. [Prognostic and predictive factors for gliomas in adults]. *Bull Cancer*. 2009 Apr;96(4):357-67. doi: 10.1684/bdc.2008.0776. Review. French. PubMed PMID: 19357011.

Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, Ellisman MH, Verma IM. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science*. 2012 Nov 23;338(6110):1080-4. doi: 10.1126/science.1226929. Epub 2012 Oct 18. PubMed PMID: 23087000; PubMed Central PMCID: PMC3595315.

Fuchs E, Chen T. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep*. 2013 Jan;14(1):39-48. doi: 10.1038/embor.2012.197. Epub 2012 Dec 11. Review. PubMed PMID: 23229591; PubMed Central PMCID: PMC3537149.

Furukawa K, Kumon Y, Harada H, Kohno S, Nagato S, Teraoka M, Fujiwara S, Nakagawa K, Hamada K, Ohnishi T. PTEN gene transfer suppresses the invasive potential of human malignant gliomas by regulating cell invasion-related molecules. *Int J Oncol.* 2006 Jul;29(1):73-81. PubMed PMID: 16773187.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004 Oct 1;64(19):7011-21. PubMed PMID: 15466194.

Gao Z, Zhang J, Bonasio R, Strino F, Sawai A, Parisi F, Kluger Y, Reinberg D. PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol Cell.* 2012 Feb 10;45(3):344-56. doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.002. PubMed PMID: 22325352; PubMed Central PMCID: PMC3293217.

Gladson CL, Prayson RA, Liu WM. The pathobiology of glioma tumors. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:33-50. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102109. Review. PubMed PMID: 19737106; PubMed Central PMCID: PMC2887670.

Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell.* 2007 Jul 13;130(1):77-88. PubMed PMID: 17632057; PubMed Central PMCID: PMC3200295.

Głowacki S, Błasiak J. [Role of 5-hydroxymethylcytosine and TET proteins in epigenetic regulation of gene expression]. Postepy Biochem. 2013;59(1):64-9. Review. Polish. PubMed PMID: 23821944.

Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 1;32(Database issue):D109-11. PubMed PMID: 14681370; PubMed Central PMCID: PMC308757.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Review. PubMed PMID: 21376230.

Hao N, Whitelaw ML, Shearwin KE, Dodd IB, Chapman-Smith A. Identification of residues in the N-terminal PAS domains important for dimerization of Arnt and AhR. *Nucleic Acids Res.* 2011

May;39(9):3695-709. doi: 10.1093/nar/gkq1336. Epub 2011 Jan 17. PubMed PMID: 21245039; PubMed Central PMCID: PMC3089468.

Hargrave D. Paediatric high and low grade glioma: the impact of tumour biology on current and future therapy. *Br J Neurosurg.* 2009 Aug;23(4):351-63. doi: 10.1080/02688690903158809. Review. PubMed PMID: 19637006.

He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.* 2005 Jun 9;435(7043):828-33. PubMed PMID: 15944707.

Heightman TD. Chemical biology of lysine demethylases. *Curr Chem Genomics.* 2011;5(Suppl 1):62-71. doi: 10.2174/1875397301005010062. Epub 2011 Aug 22. PubMed PMID: 21966346; PubMed Central PMCID: PMC3178875.

Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, Ye Z, Lee LK, Stuart RK, Ching CW, Ching KA, Antosiewicz-Bourget JE, Liu H, Zhang X, Green RD, Lobanenkov VV, Stewart R, Thomson JA, Crawford GE, Kellis M, Ren B. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature.* 2009 May 7;459(7243):108-12. doi: 10.1038/nature07829. Epub 2009 Mar 18. PubMed PMID: 19295514; PubMed Central PMCID: PMC2910248.

Higgins DM, Wang R, Milligan B, Schroeder M, Carlson B, Pokorny J, Cheshier SH, Meyer FB, Weissman IL, Sarkaria JN, Henley JR. Brain tumor stem cell multipotency correlates with nanog expression and extent of passaging in human glioblastoma xenografts. *Oncotarget.* 2013 May;4(5):792-801. PubMed PMID: 23801022; PubMed Central PMCID: PMC3742839. Horton JR, Upadhyay AK, Qi HH, Zhang X, Shi Y, Cheng X. Enzymatic and structural insights for substrate specificity of a family of jumonji histone lysine demethylases. *Nat Struct Mol Biol.* 2010 Jan;17(1):38-43. doi: 10.1038/nsmb.1753. Epub 2009 Dec 20. PubMed PMID: 20023638; PubMed Central PMCID: PMC2849977.

Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem.* 1948 Aug;175(1):315-32. PubMed PMID: 18873306.

Howells LM, Berry DP, Elliott PJ, Jacobson EW, Hoffmann E, Hegarty B, Brown K, Steward WP, Gescher AJ. Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with

hepatic metastases--safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011 Sep;4(9):1419-25. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0148. Epub 2011 Jun 16. PubMed PMID: 21680702; PubMed Central PMCID: PMC3173869.

Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, Lin R, Smith MM, Allis CD. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*. 2000 Aug 4;102(3):279-91. PubMed PMID: 10975519.

Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002 Sep 20;297(5589):2056-60. Epub 2002 Aug 1. PubMed PMID: 12154197.

Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP. Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res*. 2000 Jan 15;60(2):417-24. PubMed PMID: 10667596.

Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 2002 Sep;39(3):193-206. PubMed PMID:12203386.

Iwase S, Lan F, Bayliss P, de la Torre-Ubieta L, Huarte M, Qi HH, Whetstone JR, Bonni A, Roberts TM, Shi Y. The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell*. 2007 Mar 23;128(6):1077-88. Epub 2007 Feb 22. PubMed PMID: 17320160.

Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003 Mar;33 Suppl:245-54. Review. PubMed PMID: 12610534.

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1074-80. Review. PubMed PMID: 11498575.

Jia J, Zheng X, Hu G, Cui K, Zhang J, Zhang A, Jiang H, Lu B, Yates J 3rd, Liu C, Zhao K, Zheng Y. Regulation of pluripotency and self-renewal of ESCs through epigenetic-threshold modulation and

mRNA pruning. *Cell*. 2012 Oct 26;151(3):576-89. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.023. PubMed PMID: 23101626; PubMed Central PMCID: PMC3575637.

Kalokhe G, Grimm SA, Chandler JP, Helenowski I, Rademaker A, Raizer JJ. Metastatic glioblastoma: case presentations and a review of the literature. *J Neurooncol*. 2012 Mar;107(1):21-7. doi: 10.1007/s11060-011-0731-1. Epub 2011 Oct 2. Review. PubMed PMID: 21964740.

Kanno M, Hasegawa M, Ishida A, Isono K, Taniguchi M. mel-18, a Polycomb group-related mammalian gene, encodes a transcriptional negative regulator with tumor suppressive activity. *EMBO J*. 1995 Nov 15;14(22):5672-8. PubMed PMID: 8521824; PubMed Central PMCID: PMC394682.

Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, Yan H, Adamson C. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol*. 2009 Apr 8;3:39-52. PubMed PMID: 19777070; PubMed Central PMCID: PMC2748278.

Keramari M, Razavi J, Ingman KA, Patsch C, Edenhofer F, Ward CM, Kimber SJ. Sox2 is essential for formation of trophectoderm in the preimplantation embryo. *PLoS One*. 2010 Nov 12;5(11):e13952. doi: 10.1371/journal.pone.0013952. PubMed PMID: 21103067; PubMed Central PMCID: PMC2980489.

Karytinis A, Forneris F, Profumo A, Ciossani G, Battaglioli E, Binda C, Mattevi A. A novel mammalian flavin-dependent histone demethylase. *J Biol Chem*. 2009 Jun 26;284(26):17775-82. doi: 10.1074/jbc.M109.003087. Epub 2009 Apr 30. PubMed PMID: 19407342; PubMed Central PMCID: PMC2719416.

Ketel CS, Andersen EF, Vargas ML, Suh J, Strome S, Simon JA. Subunit contributions to histone methyltransferase activities of fly and worm polycomb group complexes. *Mol Cell Biol*. 2005 Aug;25(16):6857-68. PubMed PMID: 16055700; PubMed Central PMCID: PMC1190254.

Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):259-72. Review. PubMed PMID: 14744436.

Kim E, Kim M, Woo DH, Shin Y, Shin J, Chang N, Oh YT, Kim H, Rhee J, Nakano I, Lee C, Joo KM, Rich JN, Nam DH, Lee J. Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell*. 2013 Jun 10;23(6):839-52. doi: 10.1016/j.ccr.2013.04.008. Epub 2013 May 16. PubMed PMID: 23684459.

Kim J, Daniel J, Espejo A, Lake A, Krishna M, Xia L, Zhang Y, Bedford MT. Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep*. 2006 Apr;7(4):397-403. Epub 2006 Jan 13. PubMed PMID: 16415788; PubMed Central PMCID: PMC1456902.

Klose RJ, Yan Q, Tothova Z, Yamane K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Gilliland DG, Zhang Y, Kaelin WG Jr. The retinoblastoma binding protein RBP2 is an H3K4 demethylase. *Cell*. 2007 Mar 9;128(5):889-900. Epub 2007 Feb 22. PubMed PMID: 17320163.

Konopka G, Bonni A. Signaling pathways regulating gliomagenesis. *Curr Mol Med*. 2003 Feb;3(1):73-84. Review. PubMed PMID: 12558076.

Kornberg RD. Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem*. 1977;46:931-54. Review. PubMed PMID: 332067.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):693-705. Review. PubMed PMID: 17320507.

Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*. 2009 May 15;324(5929):929-30. doi: 10.1126/science.1169786. Epub 2009 Apr 16. PubMed PMID: 19372393; PubMed Central PMCID: PMC3263819.

Kuo MH, Zhou J, Jambeck P, Churchill ME, Allis CD. Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev*. 1998 Mar 1;12(5):627-39. PubMed PMID: 9499399; PubMed Central PMCID: PMC316582.

Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* 2002 Nov 15;16(22):2893-905. PubMed PMID: 12435631; PubMed Central PMCID: PMC187479.

Lan F, Bayliss PE, Rinn JL, Whetstine JR, Wang JK, Chen S, Iwase S, Alpatov R, Issaeva I, Canaani E, Roberts TM, Chang HY, Shi Y. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature.* 2007 Oct 11;449(7163):689-94. Epub 2007 Sep 12. PubMed PMID: 17851529.

Lau N, Feldkamp MM, Roncari L, Loehr AH, Shannon P, Gutmann DH, Guha A. Loss of neurofibromin is associated with activation of RAS/MAPK and PI3-K/AKT signaling in a neurofibromatosis 1 astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000 Sep;59(9):759-67. PubMed PMID: 11005256.

Lee CS, Sund NJ, Behr R, Herrera PL, Kaestner KH. Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic alpha-cells. *Dev Biol.* 2005 Feb 15;278(2):484-95. PubMed PMID: 15680365.

Lee MG, Norman J, Shilatifard A, Shiekhattar R. Physical and functional association of a trimethyl H3K4 demethylase and Ring6a/MBLR, a polycomb-like protein. *Cell.* 2007a Mar 9;128(5):877-87. Epub 2007 Feb 22. PubMed PMID: 17320162.

Lee MG, Villa R, Trojer P, Norman J, Yan KP, Reinberg D, Di Croce L, Shiekhattar R. Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science.* 2007b Oct 19;318(5849):447-50. Epub 2007 Aug 30. PubMed PMID: 17761849.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54. PubMed PMID: 8252621.

Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray HL, Zucker JP, Yuan B, Bell GW, Herbolzheimer E, Hannett NM, Sun K, Odom DT, Otte AP, Volkert TL, Bartel DP, Melton DA, Gifford DK, Jaenisch R, Young RA. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell.* 2006 Apr 21;125(2):301-13. PubMed PMID: 16630818; PubMed Central PMCID: PMC3773330.

Leeb M, Wutz A. Ring1B is crucial for the regulation of developmental control genes and PRC1 proteins but not X inactivation in embryonic cells. *J Cell Biol.* 2007 Jul 16;178(2):219-29. Epub 2007 Jul 9. PubMed PMID: 17620408; PubMed Central PMCID: PMC2064442.

Li A, Walling J, Kotliarov Y, Center A, Steed ME, Ahn SJ, Rosenblum M, Mikkelsen T, Zenklusen JC, Fine HA. Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Mol Cancer Res.* 2008 Jan;6(1):21-30. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0280. Epub 2008 Jan 9. PubMed PMID: 18184972.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007 Feb 1;67(3):1030-7. PubMed PMID: 17283135.

Li Z, Gadue P, Chen K, Jiao Y, Tuteja G, Schug J, Li W, Kaestner KH. Foxa2 and H2A.Z mediate nucleosome depletion during embryonic stem cell differentiation. *Cell.* 2012 Dec 21;151(7):1608-16. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.018. PubMed PMID: 23260146; PubMed Central PMCID: PMC3530164. Liang G, Lin JC, Wei V, Yoo C, Cheng JC, Nguyen CT, Weisenberger DJ, Egger G, Takai D, Gonzales FA, Jones PA. Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 11;101(19):7357-62. Epub 2004 May 3. PubMed PMID: 15123803; PubMed Central PMCID: PMC409923.

Lin Y, Yang Y, Li W, Chen Q, Li J, Pan X, Zhou L, Liu C, Chen C, He J, Cao H, Yao H, Zheng L, Xu X, Xia Z, Ren J, Xiao L, Li L, Shen B, Zhou H, Wang YJ. Reciprocal regulation of Akt and Oct4 promotes the self-renewal and survival of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell.* 2012 Nov 30;48(4):627-40. doi: 10.1016/j.molcel.2012.08.030. Epub 2012 Oct 4. PubMed PMID: 23041284; PubMed Central PMCID: PMC3601782.

Litt MD, Simpson M, Gaszner M, Allis CD, Felsenfeld G. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science.* 2001 Sep 28;293(5539):2453-5. Epub 2001 Aug 9. PubMed PMID: 11498546.

Liu B, Lin Y, Darwanto A, Song X, Xu G, Zhang K. Identification and characterization of propionylation at histone H3 lysine 23 in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2009 Nov 20; 284(47):32288-95. doi: 10.1074/jbc.M109.045856. Epub 2009 Oct 3. PubMed PMID: 19801601; PubMed Central PMCID: PMC2781642.

Liu CL, Kaplan T, Kim M, Buratowski S, Schreiber SL, Friedman N, Rando OJ. Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol.* 2005 Oct;3(10):e328. Epub 2005 Aug 30. PubMed PMID: 16122352; PubMed Central PMCID: PMC1195719.

Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet.* 2006 Apr;38(4):431-40. Epub 2006 Mar 5. PubMed PMID: 16518401.

Losman JA, Kaelin WG Jr. What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev.* 2013 Apr 15;27(8):836-52. doi: 10.1101/gad.217406.113. Review. PubMed PMID: 23630074; PubMed Central PMCID: PMC3650222.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007 Aug;114(2):97-109. Epub 2007 Jul 6. Review. Erratum in: *Acta Neuropathol.* 2007 Nov;114(5):547. PubMed PMID: 17618441; PubMed Central PMCID: PMC1929165.

Lubitz S, Glaser S, Schaft J, Stewart AF, Anastassiadis K. Increased apoptosis and skewed differentiation in mouse embryonic stem cells lacking the histone methyltransferase Mll2. *Mol Biol Cell.* 2007 Jun;18(6):2356-66. Epub 2007 Apr 11. PubMed PMID: 17429066; PubMed Central PMCID: PMC1877088.

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997 Sep 18;389(6648):251-60. PubMed PMID: 9305837.

Luger K. Dynamic nucleosomes. *Chromosome Res.* 2006;14(1):5-16. Review. PubMed PMID: 16506092.

Luis NM, Morey L, Di Croce L, Benitah SA. Polycomb in stem cells: PRC1 branches out. *Cell Stem Cell.* 2012 Jul 6;11(1):16-21. doi: 10.1016/j.stem.2012.06.005. Review. PubMed PMID: 22770239.

Lund AH, van Lohuizen M. Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr*

Opin Cell Biol. 2004 Jun;16(3):239-46. Review. PubMed PMID: 15145347.

Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 2001 Jun 1;15(11):1311-33. Review. PubMed PMID: 11390353.

Maher EA, Brennan C, Wen PY, Durso L, Ligon KL, Richardson A, Khatri D, Feng B, Sinha R, Louis DN, Quackenbush J, Black PM, Chin L, DePinho RA. Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. *Cancer Res.* 2006 Dec 1;66(23):11502-13. Epub 2006 Nov 17. PubMed PMID: 17114236.

Maltepe E, Keith B, Arsham AM, Brorson JR, Simon MC. The role of ARNT2 in tumor angiogenesis and the neural response to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jun 24;273(1):231-8. PubMed PMID: 10873592.

Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipiek C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med.* 2009 Sep 10;361(11):1058-66. doi: 10.1056/NEJMoa0903840. Epub 2009 Aug 5. PubMed PMID: 19657110; PubMed Central PMCID: PMC3201812.

Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell.* 2008 Nov 21;32(4):503-18. doi: 10.1016/j.molcel.2008.11.004. PubMed PMID: 19026781; PubMed Central PMCID: PMC3641558.

Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 2011 Jan 20;469(7330):343-9. doi: 10.1038/nature09784. Review. PubMed PMID: 21248841; PubMed Central PMCID: PMC3760771.

Marmorstein R, Trievel RC. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jan;1789(1):58-68. doi: 10.1016/j.bbagr.2008.07.009. Epub 2008 Aug 3. Review. PubMed PMID: 18722564.

Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):625-35. Epub 2007 May 21. PubMed PMID: 17515932.

Maurer-Stroh S, Dickens NJ, Hughes-Davies L, Kouzarides T, Eisenhaber F, Ponting CP. The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci*. 2003 Feb;28(2):69-74. PubMed PMID: 12575993.

McLaughlin-Drubin ME, Crum CP, Münger K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 1;108(5):2130-5. doi: 10.1073/pnas.1009933108. Epub 2011 Jan 18. PubMed PMID: 21245294; PubMed Central PMCID: PMC3033314.

Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. 2007 Aug 2;448(7153):553-60. Epub 2007 Jul 1. PubMed PMID: 17603471; PubMed Central PMCID: PMC2921165.

Mittler MA, Walters BC, Stopa EG. Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *J Neurosurg*. 1996 Dec;85(6):1091-4. PubMed PMID: 8929500.

Miyamoto K, Ushijima T. Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics. *Jpn J Clin Oncol*. 2005 Jun;35(6):293-301. Epub 2005 Jun 1. Review. PubMed PMID: 15930038.

Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB, Bibel M, Schübeler D. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors.

Mol Cell. 2008 Jun 20;30(6):755-66. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.007. Epub 2008 May 29. PubMed PMID: 18514006.

Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. Nat Rev Genet. 2004 Sep;5(9):691-701. Review. PubMed PMID: 15372092.

Morey L, Pascual G, Cozzuto L, Roma G, Wutz A, Benitah SA, Di Croce L. Nonoverlapping functions of the Polycomb group Cbx family of proteins in embryonic stem cells. Cell Stem Cell. 2012 Jan 6;10(1):47-62. doi: 10.1016/j.stem.2011.12.006. PubMed PMID: 22226355.

Mosammaparast N, Shi Y. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. Annu Rev Biochem. 2010;79:155-79. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.070907.103946. Review. PubMed PMID: 20373914.

Müller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA. Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. Cell. 2002 Oct 18;111(2):197-208. PubMed PMID: 12408864.

Murray K. The occurrence of epsilon-N-methyl lysine in histones. Biochemistry. 1964 Jan;3:10-5. PubMed PMID: 14114491.

Nager M, Bhardwaj D, Cantí C, Medina L, Nogués P, Herreros J. β -Catenin Signalling in Glioblastoma Multiforme and Glioma-Initiating Cells. Chemother Res Pract. 2012;2012:192362. doi: 10.1155/2012/192362. Epub 2012 Feb 12. PubMed PMID: 22400111; PubMed Central PMCID: PMC3286890.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell. 1990 Apr;2(4):279-289. PubMed PMID: 12354959; PubMed Central PMCID: PMC159885.

Natsume A, Ito M, Katsushima K, Ohka F, Hatanaka A, Shinjo K, Sato S, Takahashi S, Ishikawa Y, Takeuchi I, Shimogawa H, Uesugi M, Okano H, Kim SU, Wakabayashi T, Issa JP, Sekido Y, Kondo Y.

Chromatin Regulator PRC2 Is a Key Regulator of Epigenetic Plasticity in Glioblastoma. *Cancer Res.* 2013 Jul 15;73(14):4559-4570. Epub 2013 May 29. PubMed PMID: 23720055.

Newcomb EW, Alonso M, Sung T, Miller DC. Incidence of p14ARF gene deletion in high-grade adult and pediatric astrocytomas. *Hum Pathol.* 2000 Jan;31(1):115-9. PubMed PMID: 10665922.

Noll M. DNA folding in the nucleosome. *J Mol Biol.* 1977 Oct 15;116(1):49-71. PubMed PMID: 592385.

Noma K, Allis CD, Grewal SI. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1150-5. PubMed PMID: 11498594.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007 Jan 4;445(7123):106-10. Epub 2006 Nov 19. PubMed PMID: 17122772.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1445-53. Review. PubMed PMID: 17456751; PubMed Central PMCID: PMC1854940.

Ohgaki H, Kim YH, Steinbach JP. Nervous system tumors associated with familial tumor syndromes. *Curr Opin Neurol.* 2010 Dec;23(6):583-91. doi: 10.1097/WCO.0b013e3283405b5f. PubMed PMID: 21042217.

Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Aug;42(8):1348-54. doi: 10.1016/j.biocel.2010.03.004. Epub 2010 Mar 19. Review. PubMed PMID: 20227518; PubMed Central PMCID: PMC3681296.

Orlando V. Polycomb, epigenomes, and control of cell identity. *Cell.* 2003 Mar 7;112(5):599-606. Review. PubMed PMID: 12628181.

Ott M, Litzemberger UM, Sahm F, Rauschenbach KJ, Tudoran R, Hartmann C, Marquez VE, von Deimling A, Wick W, Platten M. Promotion of glioblastoma cell motility by enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is mediated by AXL receptor kinase. *PLoS One*. 2012;7(10):e47663. doi: 10.1371/journal.pone.0047663. Epub 2012 Oct 15. PubMed PMID: 23077658; PubMed Central PMCID: PMC3471855.

Pan G, Tian S, Nie J, Yang C, Ruotti V, Wei H, Jonsdottir GA, Stewart R, Thomson JA. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007 Sep 13;1(3):299-312. doi: 10.1016/j.stem.2007.08.003. PubMed PMID: 18371364.

Papagikos MA, Shaw EG, Stieber VW. Lessons learned from randomised clinical trials in adult low grade glioma. *Lancet Oncol*. 2005 Apr;6(4):240-4. Review. PubMed PMID: 15811619.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008 Sep 26;321(5897):1807-12. doi: 10.1126/science.1164382. Epub 2008 Sep 4. PubMed PMID: 18772396; PubMed Central PMCID: PMC2820389.

Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzarini Denchi E, Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4061-71. Epub 2004 Sep 23. PubMed PMID: 15385962; PubMed Central PMCID: PMC524339.

Pasini D, Hansen KH, Christensen J, Agger K, Cloos PA, Helin K. Coordinated regulation of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and Polycomb-Repressive Complex 2. *Genes Dev*. 2008 May 15;22(10):1345-55. doi: 10.1101/gad.470008. PubMed PMID: 18483221; PubMed Central PMCID: PMC2377189.

Patru C, Romao L, Varlet P, Coulombel L, Raponi E, Cadusseau J, Renault-Mihara F, Thirant C, Leonard N, Berhneim A, Mihalescu-Maingot M, Haiech J, Bièche I, Moura-Neto V, Dumas-Duport C, Junier MP, Chneiweiss H. CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. *BMC Cancer*. 2010 Feb 24;10:66. doi: 10.1186/1471-2407-10-66. PubMed PMID: 20181261; PubMed Central PMCID: PMC2841664.

Paugh BS, Qu C, Jones C, Liu Z, Adamowicz-Brice M, Zhang J, Bax DA, Coyle B, Barrow J, Hargrave D, Lowe J, Gajjar A, Zhao W, Broniscer A, Ellison DW, Grundy RG, Baker SJ. Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 20;28(18):3061-8. doi: 10.1200/JCO.2009.26.7252. Epub 2010 May 17. PubMed PMID: 20479398; PubMed Central PMCID: PMC2903336.

Peymani M, Ghoochani A, Ghaedi K, Karamali F, Karbalaie K, Kiani-Esfahani A, Rabiee F, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H. Dual effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ on embryonic stem cell self-renewal in presence and absence of leukemia inhibitory factor. *Eur J Cell Biol*. 2013 Apr-May;92(4-5):160-8. doi: 10.1016/j.ejcb.2013.03.003. Epub 2013 Apr 4. PubMed PMID: 23628590.

Pfister S, Witt O. Pediatric gliomas. *Recent Results Cancer Res*. 2009;171:67-81. doi: 10.1007/978-3-540-31206-2_4. Review. PubMed PMID: 19322538.

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006 Mar;9(3):157-73. PubMed PMID: 16530701.

Pollack IF, Finkelstein SD, Burnham J, Holmes EJ, Hamilton RL, Yates AJ, Finlay JL, Sposto R; Children's Cancer Group. Age and TP53 mutation frequency in childhood malignant gliomas: results in a multi-institutional cohort. *Cancer Res*. 2001 Oct 15;61(20):7404-7. PubMed PMID: 11606370.

Puget S, Philippe C, Bax DA, Job B, Varlet P, Junier MP, Andreiuolo F, Carvalho D, Reis R, Guerrini-Rousseau L, Roujeau T, Dessen P, Richon C, Lazar V, Le Teuff G, Sainte-Rose C, Georger B, Vassal G, Jones C, Grill J. Mesenchymal transition and PDGFRA amplification/mutation are key distinct oncogenic events in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *PLoS One*. 2012;7(2):e30313. doi: 10.1371/journal.pone.0030313. Epub 2012 Feb 28. PubMed PMID: 22389665; PubMed Central PMCID: PMC3289615.

Qin XY, Wei F, Yoshinaga J, Yonemoto J, Tanokura M, Sone H. siRNA-mediated knockdown of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 affects hypoxia-inducible factor-1 regulatory signaling and

metabolism in human breast cancer cells. *FEBS Lett.* 2011 Oct 20;585(20):3310-5. doi: 10.1016/j.febslet.2011.09.017. Epub 2011 Sep 19. PubMed PMID: 21945317.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000 Feb 24;403(6772):901-6. PubMed PMID: 10706289.

Rheinbay E, Suvà ML, Gillespie SM, Wakimoto H, Patel AP, Shahid M, Oksuz O, Rabkin SD, Martuza RL, Rivera MN, Louis DN, Kasif S, Chi AS, Bernstein BE. An aberrant transcription factor network essential for Wnt signaling and stem cell maintenance in glioblastoma. *Cell Rep.* 2013 May 30;3(5):1567-79. doi: 10.1016/j.celrep.2013.04.021. Epub 2013 May 23. PubMed PMID: 23707066.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007 Jan 4;445(7123):111-5. Epub 2006 Nov 19. PubMed PMID: 17122771.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005 Aug;6(8):597-610. Review. PubMed PMID: 16136652.

Rochon C, Frouin V, Bortoli S, Giraud-Triboulet K, Duverger V, Vaigot P, Petat C, Fouchet P, Lassalle B, Alibert O, Gidrol X, Piétu G. Comparison of gene expression pattern in SP cell populations from four tissues to define common "stemness functions". *Exp Cell Res.* 2006 Jul 1;312(11):2074-82. Epub 2006 Apr 19. PubMed PMID: 16624286.

Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):24731-7. Epub 2005 Apr 27. PubMed PMID: 15860457.

Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature.* 2002 Sep 26;419(6905):407-11. Epub 2002 Sep 11. PubMed PMID: 12353038.

Santos-Rosa H, Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*. 2005 Nov;41(16):2381-402. Epub 2005 Oct 13. Review. PubMed PMID: 16226460.

Sawan C, Vaissière T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res*. 2008 Jul 3;642(1-2):1-13. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.03.002. Epub 2008 Mar 25. Review. PubMed PMID: 18471836.

Sawan C, Herceg Z. Histone modifications and cancer. *Adv Genet*. 2010;70:57-85. doi: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60003-4. Review. PubMed PMID: 20920745.

Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol*. 2004 Jan;6(1):73-7. Epub 2003 Dec 7. Erratum in: *Nat Cell Biol*. 2004 May;6(5):465. PubMed PMID: 14661024.

Schuettengruber B, Martinez AM, Iovino N, Cavalli G. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Nov 23;12(12):799-814. doi: 10.1038/nrm3230. Review. PubMed PMID: 22108599.

Schwartz YB, Kahn TG, Dellino GI, Pirrotta V. Polycomb silencing mechanisms in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2004;69:301-8. PubMed PMID: 16117662.

Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang DA, Tönjes M, Hovestadt V, Albrecht S, Kool M, Nantel A, Konermann C, Lindroth A, Jäger N, Rausch T, Ryzhova M, Korbel JO, Hielscher T, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Ebinger M, Schuhmann MU, Scheurle W, Pekrun A, Frühwald MC, Roggendorf W, Kramm C, Dürken M, Atkinson J, Lepage P, Montpetit A, Zakrzewska M, Zakrzewski K, Liberski PP, Dong Z, Siegel P, Kulozik AE, Zapatka M, Guha A, Malkin D, Felsberg J, Reifenberger G, von Deimling A, Ichimura K, Collins VP, Witt H, Milde T, Witt O, Zhang C, Castelo-Branco P, Lichter P, Faury D, Tabori U, Plass C, Majewski J, Pfister SM, Jabado N. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 2012 Jan 29;482(7384):226-31. doi: 10.1038/nature10833. Erratum in: *Nature*. 2012 Apr 5;484(7392):130. PubMed PMID: 22286061.

“La clé du génie d'Einstein ? “, *Science et Vie*, novembre 2005, page 71.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003 Oct;3(10):721-32. Review. PubMed PMID: 13130303.

Shao Z, Raible F, Mollaaghababa R, Guyon JR, Wu CT, Bender W, Kingston RE. Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell*. 1999 Jul 9;98(1):37-46. PubMed PMID: 10412979.

Sharif A, Legendre P, Prévot V, Allet C, Romao L, Studler JM, Chneiweiss H, Junier MP. Transforming growth factor alpha promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells. *Oncogene*. 2007 Apr 26;26(19):2695-706. Epub 2006 Oct 23. PubMed PMID: 17057735.

Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Peña P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Côté J, Chua KF, Gozani O. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature*. 2006 Jul 6;442(7098):96-9. Epub 2006 May 21. PubMed PMID: 16728974; PubMed Central PMCID: PMC3089773.

Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 2004 Dec 29;119(7):941-53. PubMed PMID: 15620353.

Sievert AJ, Fisher MJ. Pediatric low-grade gliomas. *J Child Neurol*. 2009 Nov;24(11):1397-408. doi: 10.1177/0883073809342005. Review. PubMed PMID: 19841428; PubMed Central PMCID: PMC2917804.

Silber J, Jacobsen A, Ozawa T, Harinath G, Pedraza A, Sander C, Holland EC, Huse JT. miR-34a repression in proneural malignant gliomas upregulates expression of its target PDGFRA and promotes tumorigenesis. *PLoS One*. 2012;7(3):e33844. doi: 10.1371/journal.pone.0033844. Epub 2012 Mar 27. PubMed PMID: 22479456; PubMed Central PMCID: PMC3313940.

Sims RJ 3rd, Nishioka K, Reinberg D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet*. 2003 Nov;19(11):629-39. Review. PubMed PMID: 14585615.

Sims RJ 3rd, Reinberg D. Histone H3 Lys 4 methylation: caught in a bind? *Genes Dev.* 2006 Oct 15;20(20):2779-86. Review. PubMed PMID: 17043307.

Sims RJ 3rd, Trojer P, Li G, Reinberg D. Methods to identify and functionally analyze factors that specifically recognize histone lysine methylation. *Methods.* 2006 Dec;40(4):331-8. PubMed PMID: 17101445; PubMed Central PMCID: PMC2131717.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004 Nov 18;432(7015):396-401. PubMed PMID: 15549107.

Snippert HJ, Clevers H. Tracking adult stem cells. *EMBO Rep.* 2011 Feb;12(2):113-22. doi: 10.1038/embor.2010.216. Epub 2011 Jan 21. Review. PubMed PMID: 21252944; PubMed Central PMCID: PMC3049439.

Spannhoff A, Hauser AT, Heinke R, Sippl W, Jung M. The emerging therapeutic potential of histone methyltransferase and demethylase inhibitors. *ChemMedChem.* 2009 Oct;4(10):1568-82. doi: 10.1002/cmdc.200900301. Review. PubMed PMID: 19739196.

Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Dec 29;351(4):820-4. Epub 2006 Nov 2. PubMed PMID: 17097610.

Suvà ML, Riggi N, Janiszewska M, Radovanovic I, Provero P, Stehle JC, Baumer K, Le Bitoux MA, Marino D, Cironi L, Marquez VE, Clément V, Stamenkovic I. EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Res.* 2009 Dec 15;69(24):9211-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1622. Epub . PubMed PMID: 19934320. Stock JK, Giadrossi S, Casanova M, Brookes E, Vidal M, Koseki H, Brockdorff N, Fisher AG, Pombo A. Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Dec;9(12):1428-35. Epub 2007 Nov 25. PubMed PMID: 18037880.

Strahl BD, Ohba R, Cook RG, Allis CD. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Dec 21;96(26):14967-72. PubMed PMID: 10611321; PubMed Central PMCID: PMC24756.

Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000 Jan 6;403(6765):41-5. PubMed PMID: 10638745.

Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, Foster R, Dombkowski D, Preffer F, Maclaughlin DT, Donahoe PK. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul 25;103(30):11154-9. Epub 2006 Jul 18. PubMed PMID: 16849428; PubMed Central PMCID: PMC1544057.

Tahiliani M, Mei P, Fang R, Leonor T, Rutenberg M, Shimizu F, Li J, Rao A, Shi Y. The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation. *Nature*. 2007 May 31;447(7144):601-5. Epub 2007 Apr 29. PubMed PMID: 17468742.

Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009 May 15;324(5929):930-5. doi: 10.1126/science.1170116. Epub 2009 Apr 16. PubMed PMID: 19372391; PubMed Central PMCID: PMC2715015.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 2004 Jun 1;64(11):3753-6. PubMed PMID: 15172979.

Tataria M, Perryman SV, Sylvester KG. Stem cells: tissue regeneration and cancer. *Semin Pediatr Surg*. 2006 Nov;15(4):284-92. Review. PubMed PMID: 17055959.

Thirant C, Bessette B, Varlet P, Puget S, Cadusseau J, Tavares Sdos R, Studler JM, Silvestre DC, Susini A, Villa C, Miquel C, Bogeas A, Surena AL, Dias-Morais A, Léonard N, Pflumio F, Bièche I, Boussin FD, Sainte-Rose C, Grill J, Daumas-Duport C, Chneiweiss H, Junier MP. Clinical relevance of tumor cells with stem-like properties in pediatric brain tumors. *PLoS One*. 2011 Jan 28;6(1):e16375. doi: 10.1371/journal.pone.0016375. PubMed PMID: 21297991; PubMed Central PMCID: PMC3030582.

Thomas SL, Alam R, Lemke N, Schultz LR, Gutiérrez JA, Rempel SA. PTEN augments SPARC suppression of proliferation and inhibits SPARC-induced migration by suppressing SHC-RAF-ERK and AKT signaling. *Neuro Oncol.* 2010 Sep;12(9):941-55. doi: 10.1093/neuonc/noq048. Epub 2010 May 14. PubMed PMID: 20472716; PubMed Central PMCID: PMC2940688.

Tie F, Prasad-Sinha J, Birve A, Rasmuson-Lestander A, Harte PJ. A 1-megadalton ESC/E(Z) complex from *Drosophila* that contains polycomblike and RPD3. *Mol Cell Biol.* 2003 May;23(9):3352-62. PubMed PMID: 12697833; PubMed Central PMCID: PMC153183.

Tsai CC, Su PF, Huang YF, Yew TL, Hung SC. Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell.* 2012 Jul 27;47(2):169-82. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.020. Epub 2012 Jul 12. PubMed PMID: 22795133.

Varlet P, Jouvét A, Miquel C, Saint-Pierre G, Beuvon F, Daumas-Duport C. [Criteria of diagnosis and grading of oligodendrogliomas or oligo-astrocytomas according to the WHO and Sainte-Anne classifications]. *Neurochirurgie.* 2005 Sep;51(3-4 Pt 2):239-46. French. PubMed PMID: 16292167.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010 Jan 19;17(1):98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020. PubMed PMID: 20129251; PubMed Central PMCID: PMC2818769.

Vermeulen M, Mulder KW, Denissov S, Pijnappel WW, van Schaik FM, Varier RA, Baltissen MP, Stunnenberg HG, Mann M, Timmers HT. Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell.* 2007 Oct 5;131(1):58-69. Epub 2007 Sep 20. PubMed PMID: 17884155.

Vermeulen M, Eberl HC, Matarese F, Marks H, Denissov S, Butter F, Lee KK, Olsen JV, Hyman AA, Stunnenberg HG, Mann M. Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell.* 2010 Sep 17;142(6):967-80. doi: 10.1016/j.cell.2010.08.020. PubMed PMID: 20850016.

Vitucci M, Hayes DN, Miller CR. Gene expression profiling of gliomas: merging genomic and histopathological classification for personalised therapy. *Br J Cancer*. 2011 Feb 15;104(4):545-53. doi: 10.1038/sj.bjc.6606031. Epub 2010 Nov 30. Review. PubMed PMID: 21119666; PubMed Central PMCID: PMC3049580.

Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol*. 2012 Feb;41(1):10-3. doi: 10.1093/ije/dyr184. Epub 2011 Dec 20. PubMed PMID: 22186258.

Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*. 2004 Oct 14;431(7010):873-8. Epub 2004 Sep 22. PubMed PMID: 15386022.

Wang JK, Tsai MC, Poulin G, Adler AS, Chen S, Liu H, Shi Y, Chang HY. The histone demethylase UTX enables RB-dependent cell fate control. *Genes Dev*. 2010 Feb 15;24(4):327-32. doi: 10.1101/gad.1882610. Epub 2010 Feb 1. PubMed PMID: 20123895; PubMed Central PMCID: PMC2816731.

Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012 Apr 6;10(4):440-54. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.016. PubMed PMID: 22482508.

Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*. 1994 Feb 11;76(3):567-76. PubMed PMID: 8313476. Wu M, Wang PF, Lee JS, Martin-Brown S, Florens L, Washburn M, Shilatifard A. Molecular regulation of H3K4 trimethylation by Wdr82, a component of human Set1/COMPASS. *Mol Cell Biol*. 2008 Dec;28(24):7337-44. doi: 10.1128/MCB.00976-08. Epub 2008 Oct 6. PubMed PMID: 18838538; PubMed Central PMCID: PMC2593441.

Wicha MS. Identification of murine mammary stem cells: implications for studies of mammary development and carcinogenesis. *Breast Cancer Res*. 2006;8(5):109. PubMed PMID: 16934104; PubMed Central PMCID: PMC1779494.

Woods SL, Whitelaw ML. Differential activities of murine single minded 1 (SIM1) and SIM2 on a hypoxic response element. Cross-talk between basic helix-loop-helix/per-Arnt-Sim homology transcription factors. *J Biol Chem*. 2002 Mar 22;277(12):10236-43. Epub 2002 Jan 8. PubMed PMID: 11782478.

Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfors J, Qu C, Ding L, Huether R, Parker M, Zhang J, Gajjar A, Dyer MA, Mullighan CG, Gilbertson RJ, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Ellison DW, Zhang J, Baker SJ; St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet*. 2012 Jan 29;44(3):251-3. doi: 10.1038/ng.1102. PubMed PMID: 22286216; PubMed Central PMCID: PMC3288377.

Wysocka J. Identifying novel proteins recognizing histone modifications using peptide pull-down assay. *Methods*. 2006 Dec;40(4):339-43. PubMed PMID: 17101446.

Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, Kauer M, Tackett AJ, Chait BT, Badenhorst P, Wu C, Allis CD. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*. 2006 Jul 6;442(7098):86-90. Epub 2006 May 21. PubMed PMID: 16728976.

Xie R, Everett LJ, Lim HW, Patel NA, Schug J, Kroon E, Kelly OG, Wang A, D'Amour KA, Robins AJ, Won KJ, Kaestner KH, Sander M. Dynamic chromatin remodeling mediated by polycomb proteins orchestrates pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013 Feb 7;12(2):224-37. doi: 10.1016/j.stem.2012.11.023. Epub 2013 Jan 11. PubMed PMID: 23318056; PubMed Central PMCID: PMC3619036.

Yamane K, Tateishi K, Klose RJ, Fang J, Fabrizio LA, Erdjument-Bromage H, Taylor-Papadimitriou J, Tempst P, Zhang Y. PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Mol Cell*. 2007 Mar 23;25(6):801-12. Epub 2007 Mar 15. PubMed PMID: 17363312.

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):765-73. doi: 10.1056/NEJMoa0808710. PubMed PMID: 19228619; PubMed Central PMCID: PMC2820383. Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GA, Korsmeyer SJ. Altered Hox expression and segmental identity in Mll mutant mice. *Nature*. 1995 Nov 30;378(6556):505-8. PubMed PMID: 7477409.

Yu L, Wang Y, Huang S, Wang J, Deng Z, Zhang Q, Wu W, Zhang X, Liu Z, Gong W, Chen Z. Structural insights into a novel histone demethylase PHF8. *Cell Res.* 2010 Feb;20(2):166-73. doi: 10.1038/cr.2010.8. Epub 2010 Jan 26. PubMed PMID: 20101266.

Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, Ngwabyt SN, Borges I, Ruiz i Altaba A. NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *EMBO J.* 2010 Aug 4;29(15):2659-74. doi: 10.1038/emboj.2010.137. Epub 2010 Jun 25. PubMed PMID: 20581802; PubMed Central PMCID: PMC2928692.

Zhao XD, Han X, Chew JL, Liu J, Chiu KP, Choo A, Orlov YL, Sung WK, Shahab A, Kuznetsov VA, Bourque G, Oh S, Ruan Y, Ng HH, Wei CL. Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007 Sep 13;1(3):286-98. doi: 10.1016/j.stem.2007.08.004. PubMed PMID: 18371363.

Zhang N, Wei P, Gong A, Chiu WT, Lee HT, Colman H, Huang H, Xue J, Liu M, Wang Y, Sawaya R, Xie K, Yung WK, Medema RH, He X, Huang S. FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2011 Oct 18;20(4):427-42. doi: 10.1016/j.ccr.2011.08.016. PubMed PMID: 22014570; PubMed Central PMCID: PMC3199318.

Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res.* 2008 Jun 1;68(11):4311-20. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0364. PubMed PMID: 18519691; PubMed Central PMCID: PMC2553722.

Zhang X, Wen H, Shi X. Lysine methylation: beyond histones. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2012 Jan;44(1):14-27. doi: 10.1093/abbs/gmr100. Review. PubMed PMID: 22194010.

Zhang X, Fu R, Yu J, Wu X. DNA Demethylation: Where Genetics Meets Epigenetics. *Curr Pharm Des.* 2013 Jul 19. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23888938.

Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 2001 Sep 15;15(18):2343-60. Review. PubMed PMID: 11562345.

Zheng H, Ying H, Wiedemeyer R, Yan H, Quayle SN, Ivanova EV, Paik JH, Zhang H, Xiao Y, Perry SR, Hu J, Vinjamoori A, Gan B, Sahin E, Chheda MG, Brennan C, Wang YA, Hahn WC, Chin L, DePinho RA. PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas. *Cancer Cell.* 2010 May 18;17(5):497-509. doi: 10.1016/j.ccr.2010.03.020. PubMed PMID: 20478531; PubMed Central PMCID: PMC2900858.

Zhu Y, Harada T, Liu L, Lush ME, Guignard F, Harada C, Burns DK, Bajenaru ML, Gutmann DH, Parada LF. Inactivation of NF1 in CNS causes increased glial progenitor proliferation and optic glioma formation. *Development.* 2005 Dec;132(24):5577-88. PubMed PMID: 16314489; PubMed Central PMCID: PMC2760350.