



HAL
open science

Étude fonctionnelle de la sous-unité régulatrice de la protéine kinase CK2 dans les cellules souches embryonnaires murines : survie cellulaire, oligodendrogenèse et cancérogenèse.

Léa Ziercher

► To cite this version:

Léa Ziercher. Étude fonctionnelle de la sous-unité régulatrice de la protéine kinase CK2 dans les cellules souches embryonnaires murines : survie cellulaire, oligodendrogenèse et cancérogenèse.. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00188215

HAL Id: tel-00188215

<https://theses.hal.science/tel-00188215>

Submitted on 16 Nov 2007

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 Joseph Fourier – Grenoble 1

Ecole Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

THESE

Biologie Cellulaire et Moléculaire

Léa ZIERCHER

**ÉTUDE FONCTIONNELLE DE LA SOUS-UNITE REGULATRICE
DE LA PROTEINE KINASE CK2
DANS LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES MURINES :
SURVIE CELLULAIRE, OLIGODENDROGENESE ET CANCEROGENESE.**

Thèse dirigée par : Thierry BUCHOU

Le 11 octobre 2007

Jury :

Stephan NONCHEV
Véronique BALDIN
Nicole THOMASSET
Thierry BUCHOU

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

Laboratoire Transduction du Signal : signalisation calcique, phosphorylation et inflammation
INSERM U873 (ex EMI 0104)
CEA Grenoble, IRTSV (ex DRDC)

Celui qui trébuche va plus loin que celui qui n'avance pas...

Remerciements.

Je souhaite exprimer mes remerciements :

Aux membres du jury, Stephan Nonchev, Véronique Badin et Nicole Thomasset qui ont accepté de consacrer leur temps pour la lecture et la critique de ce travail de thèse.

A la Ligue Nationale Contre le Cancer qui a financé mes 3 années de doctorat.

A Jacques Baudier et Claude Cochet qui m'ont accueillie respectivement au sein de leur laboratoire et équipe.

A Thierry Buchou qui m'a orientée au cours de ce travail, me faisant profiter de son expérience, et qui a consacré un temps important à la lecture de ce manuscrit. Un honnête et réel merci pour la qualité de son encadrement technique et scientifique et pour nos nombreuses discussions à propos du manuscrit, de la soutenance, et de mon avenir.

Un immense merci à mes précieuses amies Sophie et Sophie, pour leur amitié à toute épreuve et leur soutien. Puisse chacune d'entre elles continuer à être heureuse dans leur couple et dans la voie qu'elles ont choisie. Merci à "Grand-Fred" pour son amitié sincère et sa présence à mes côtés, tout simplement. Merci à tous les autres, qui, souvent malheureusement de trop loin, m'ont toujours apporté leur amitié et leurs encouragements : Sami et Maud, Audrey (Meow !), Edwige, Guillaume (Milo-kun), Greg, Mikal, Stéphanie... Et à toutes les personnes rencontrées au cours de ces 4 longues années, pour leur sincère affection, leur compréhension et leur réconfort, toujours à me pousser en avant vers la réalisation de mes rêves, troublés ou ébréchés, parfois même brisés... Ils sont trop nombreux pour être cités, mais tous sont dans mon cœur.

J'aimerais exprimer tout mon amour à ma famille qui n'a cessé de croire en moi et de m'épauler, sans qui j'aurais baissé les bras il y a bien longtemps.

Merci à ma belle-famille pour la simplicité avec laquelle elle m'a accueillie.

Et bien sûr, merci d'être toi, Fred. Tout semble si simple à tes côtés...

A mes regrettés grands-parents.

.Sommaire.

Table des illustrations.	6
Liste des abréviations et anglicismes.	8
.INTRODUCTION .	10 à 98
Partie 1 : Les cellules souches.	11
I/ Le concept de cellules souches.	12
I.1/ Cellules souches embryonnaires, cellules souches adultes.	12
I.2/ Plasticité cellulaire et épigénétisme.	18
II/ Les cellules souches embryonnaires.	22
II.1/ L'auto-renouvellement et le maintien de l'état indifférencié des cellules ES.	25
II.2/ La différenciation des cellules souches embryonnaires.	31
II.3/ Induction de tératocarcinomes à partir de cellules souches embryonnaires.	37
III/ Les cellules souches neurales.	40
III.1/ Découverte et promesses des cellules souches neurales.	40
III.2/ Les cellules souches neurales embryonnaires et adultes <i>in vivo</i> .	45
III.3/ Spécification des cellules souches neurales.	51
III.4/ Contrôle de la différenciation des cellules souches neurales.	54
III.5/ Oligodendrogenèse.	59
IV/ Le concept de cellules souches cancéreuses.	68
Partie 2 : La protéine kinase CK2.	74
I/ Les protéines kinases.	75
II/ La protéine kinase CK2.	78
II.1/ Généralités.	78
II.2/ CK2 et cancer.	84
II.3/ La sous-unité régulatrice CK2 β .	88
II.3.a/ Structure de la sous-unité régulatrice CK2 β .	88
II.3.b/ Fonction de CK2 β indépendante de CK2 α .	97
II.3.c/ Etude <i>in vivo</i> de la sous-unité CK2 β .	97
Partie 3 : Projet de recherche.	102

.MATERIEL ET METHODES.

106 à 120

I/ Obtention des lignées cellulaires CK2 β ^{-/-} exprimant une forme exogène HA-CK2 β sauvage ou mutée.	107
I.1/Construction des plasmides pMSCV HA-CK2 β /néo ^R .	107
I.2/ Production des rétrovirus MSCV Cre/puro ^R et MSCV HA-CK2 β /néo ^R .	109
I.3/ Culture des cellules ES.	109
I.4/ Infection des cellules ES ; obtention de clones stables néo ^R et/ou puro ^R .	110
I.5/ Expériences de restauration de la viabilité cellulaire.	110
I.6/ Génotypage des clones ES néo ^R puro ^R .	111
I.6.a/ Analyse par PCR (Polymerase Chain Reaction).	111
I.6.b/ Analyse par hybridation d'une sonde ADN (Southern Blot).	111
I.7/ Analyse de l'expression des protéines HA-CK2 β exogène et CK2 β endogène par immuno empreinte (Western Blot).	113
II/ Caractérisation des lignées cellulaires nullizygotés CK2 β ^{-/-} exprimant une forme exogène HA-CK2 β .	114
II.1/ Etude de la prolifération des cellules ES.	114
II.2/ Différenciation des cellules ES D/R en cellules neurales.	114
II.3/ Coloration hématoxyline/éosine des corps embryoïdes.	115
II.4/ Extraction d'ARN à partir de corps embryoïdes et RT-PCR.	115
II.5/ Analyse par immunohistochimie des neurosphères après différenciation.	116
III/ Induction et analyse histologique de tératocarcinomes.	118
III.1/ Induction de tératocarcinomes à partir de cellules souches embryonnaires.	118
III.2/ Analyse protéique des tumeurs.	118
III.3/ Fixation, inclusion paraffine, coupe, coloration et immunohistologie des tératocarcinomes.	119

.RESULTATS.

121 à 139

I/ Mise au point et validation du modèle cellulaire nécessaire à l'étude de CK2 β <i>in vivo</i> .	122
II/ Expériences d'inactivation conditionnelle et restauration de la viabilité cellulaire par un mutant de la protéine CK2 β .	125
III/ Étude phénotypique des lignées cellulaires CK2 β ^{-/-} exprimant une forme exogène mutante de CK2 β .	127
III.1/ Prolifération cellulaire.	127
III.2./ Différenciation.	127

Article : *CK2 β gene function is essential during brain development for the maintenance of neural stem cell and the oligodendroglial differentiation.* Ziercher L, Blond O, Raponi E, Balenci L, Deloulme JC, Filhol O, Baudier J, Boldyreff B, Cochet C, Buchou T. 131

III.3/ Résultats complémentaires.	132
III.3.a/ Analyses des corps embryoides obtenus à partir des lignées cellulaires CK2 β ^{-/-} exprimant une forme exogène mutante de CK2 β .	132
III.3.b/ Différenciation des cellules ES en cellules neurales CK2 β ^{-/-} exprimant différentes formes mutantes de la protéine exogène HA-CK2 β .	132
III.3.c/ Génération de tératocarcinomes à partir des cellules ES CK2 β ^{-/-} HA-CK2 β ^{Δ2} .	138

.DISCUSSION. **140 à 149**

I/ Implication de la protéine CK2 β dans la biologie des cellules souches.	141
II/ Validité du modèle ?	144
II.1/ Efficacité de l'invalidation conditionnelle.	144
II.2/ Qualité de la différenciation neurale à partir des corps embryoides.	145
III/ Perspectives.	149

.BIBLIOGRAPHIE. **150 à 172**

Table des illustrations.

Figure 1. Développement embryonnaire pré-implantatoire.	13
Figure 2. Développement des cellules souches durant l'ontogenèse.	13
Figure 3. Cellules souches adultes et environnement.	15
Figure 4. Développement de l'embryon murin entre E2,5 et E5,5.	23
Figure 5. Synergie d'action de BMP4, du LIF, et des membre de la famille WNT, dans le maintien de l'état indifférencié des cellules ES murines.	27
Figure 6. Régulation du devenir des cellules ES par les Src kinases.	28
Figure 7. Rôles des protéines Oct-3/4, Nanog et STAT3.	30
Figure 8. Action concertée de Sall4, Oct4 et Nanog chez l'embryon murin précoce pour contrôler le destin des cellules ES.	34
Figure 9. Spécification des cellules ES en cellules du neurectoderme.	36
Figure 10. Différenciation des cellules pro-neurales issues des cellules ES dans les différents types de cellules neurales.	36
Figure 11. Histologie des tératocarcinomes obtenus après injection sous-cutanée de cellules ES chez la souris.	39
Figure 12. Localisation des cellules souches neurales.	41
Figure 13. Cellules souches neurales et lignages cellulaires au niveau des ventricules latéraux du cerveau de mammifère.	47
Figure 14. Organisation et types cellulaires des deux régions majeures de neurogenèse du cerveau adulte murin.	49
Figure 15. Divisions symétriques et asymétriques des cellules souches neurales et des progéniteurs.	52
Figure 17. Coordination de l'identité spatio-temporelle des cellules souches neurales.	58
Figure 18. Les différentes étapes de l'oligodendrogenèse.	60
Figure 19. Génération séquentielle des progéniteurs d'oligodendrocytes dans la moelle épinière et le télencéphale.	66
Figure 20. Parallèle entre cellules souches et cellules souches cancéreuses.	69
Figure 21. Implications thérapeutiques de l'existence des cellules souches cancéreuses.	72
Figure 22. Le kinome humain.	76/77
Figure 23. Structure tridimensionnelle de l'holoenzyme tétramérique $\alpha_2\beta_2$.	79
Figure 24. Dynamique de l'holoenzyme CK2.	83
Figure 25. Implications de la CK2 dans la survie cellulaire.	86
Figure 26. Comparaison des séquences de la protéine CK2 β au cours de l'évolution.	89
Figure 27. Structure cristallographique du dimère de CK2 β et de l'holoenzyme CK2 $\alpha_2\beta_2$.	90/91
Figure 28. Eléments remarquables de la protéine CK2 β .	93
Figure 29. Association supra-moléculaire de la CK2.	96

Figure 30. Phénotype nullizygote et hétérozygote liés au gène murin <i>CK2β</i> .	99/100
Figure 31. Invalidation conditionnelle du gène <i>CK2β</i> .	104
Figure 32. Modèle cellulaire d'invalidation conditionnelle du gène <i>CK2β</i> et restauration de la viabilité par l'expression rétrovirale de la protéine étiquetée.	104
Figure 33. Carte de restriction et site de clonage multiple du vecteur pMSCVneo.	108
Figure 34. Génotypage des cellules ES : allèles <i>CK2β</i> .	112
Figure 35. Validation du système d'invalidation conditionnelle et restauration de la viabilité cellulaire.	123
Figure 36. Résultats des expériences d'invalidation et restauration de la viabilité des cellules souches embryonnaires.	126
Figure 37. Etude de la prolifération des lignées cellulaires <i>CK2β</i> ^{-/-} exprimant une forme exogène HA- <i>CK2β</i> .	128
Figure 38. Différenciation des cellules ES en cellules neurales.	130
Figure 39. Clichés de microscopie optique des corps embryoïdes et des neurosphères issus des différentes lignées cellulaires générées.	133
Figure 40. Analyse semi-quantitative de l'expression de marqueurs neuraux dans des corps embryoïdes obtenus à partir des différentes lignées de cellules ES <i>CK2β</i> ^{-/-} exprimant une forme exogène HA- <i>CK2β</i> .	134
Figure 41. Analyse par immunohistochimie de la différenciation des cellules souches neurales issues des cellules souches embryonnaires <i>CK2β</i> ^{-/-} exprimant la protéine exogène HA- <i>CK2β</i> ^{WT} , HA- <i>CK2β</i> ^{Δ2} et HA- <i>CK2β</i> ^{Glu60,61,63Ala} .	135
Figure 42. Différenciation des cellules ES <i>CK2β</i> ^{-/-} HA- <i>CK2β</i> ^{Ser2,3,4Ala} en cellules neurales.	137
Figure 43. Induction de tératocarcinomes à partir de cellules souches embryonnaires <i>CK2β</i> ^{-/-} HA- <i>CK2β</i> ^{Δ2} .	139
Figure 44. Améliorations proposées du protocole de différenciation neurale des cellules ES.	148

Liste des abréviations et anglicismes.

ADN	=	acide désoxyribonucléique
ADNc	=	ADN complémentaire
Amp	=	gène de résistance à l'ampicilline
AKT	=	protéine kinase B
AMPc	=	<i>adenosine 3',5'-cyclic monophosphate</i>
AR	=	acide rétinoïque
ARN	=	acide ribonucléique
ASC	=	<i>Adult Stem Cells</i>
Bcl-2	=	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
bHLH	=	<i>basic Helix Loop Helix</i>
BMP(R)	=	<i>Bone Morphogenic Protein (Receptor)</i>
Cdx2	=	<i>Caudal-related homeodomain protein</i>
CFTR	=	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
CNTF	=	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
C-ter	=	partie C-terminale de la protéine
DMEM	=	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	=	diméthyl sulphoxyde
E	=	<i>Embryonic day</i>
EB	=	<i>Embryoid Bodies</i>
EDTA	=	éthylène diamine tétra acétique
EGF	=	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK	=	<i>Extra-cellular-signal-Regulated Kinase</i>
ES	=	<i>Embryonic Stem (cells)</i> = cellules souches embryonnaires
<i>Feeders</i>	=	cellules nourricières
(b)FGF	=	<i>(basic) Fibroblast Growth Factor</i>
GalC	=	galacto-cérébroside
GFAP	=	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
Gro/TLE	=	<i>Groucho/Transducin-Like Enhancer of split</i>
Hes	=	<i>Hairy Enhancer of Split</i>
IGF	=	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
JAK	=	<i>Janus-Associated tyrosine Kinase</i>
kb (1000pb)	=	kilopaire(s) de bases
LeX	=	marqueur de cellules souches Lewis X (ou SSEA1 ou CD15)
LIF	=	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
LINE-1	=	<i>Long Interspersed Nuclear Element-1 (L1)</i>
LRP5/6	=	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6</i>
LTR	=	<i>Long Terminal Repeat</i>
MAPK	=	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MBP	=	<i>myelin basic protein</i>
MCS	=	<i>MultiCloning Site</i>
MDR	=	<i>Multi Drug Resistance</i>

MEF	=	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
MELK	=	<i>Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase</i>
MSCV	=	<i>Murine Steam Cell Virus</i>
Myt1	=	<i>Myelin transcription factor 1</i>
N-CoR	=	<i>Nuclear Receptor Corepressor</i>
Néo	=	gène de résistance à la néomycine
Neurod4	=	<i>Neurogenic differentiation 4</i>
Ngn	=	<i>Neurogenin</i>
NG2	=	protéoglycane chondroïtine-sulfate
N-ter	=	partie N-terminale de la protéine
O4	=	marqueur oligodendrocytaire
Oct4	=	facteur de transcription à domaine POU
Olig 1/2	=	facteur de transcription de la lignée oligodendrocytaire 1/2
PARP	=	<i>Poly ADP Ribose Polymerase</i>
pb	=	paire(s) de bases
PBS	=	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	=	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF(R)	=	<i>Platelet-Derived Growth Factor (Receptor)</i>
PI3K	=	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PLP	=	<i>proteolipid protein</i>
puro	=	gène de résistance à la puromycine
Ras	=	<i>Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RMS	=	<i>Rostral Migratory Stream</i>
RT-PCR	=	<i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	=	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
siRNA	=	<i>Small interfering RNA</i>
Sox	=	<i>SRY-box containing gene</i>
Src	=	<i>Rous sarcoma protein kinase</i>
SHH	=	<i>Sonic HedgeHog</i>
Sh RNA	=	<i>small hairpin RNA</i>
SMO	=	<i>Smoothened</i>
SSC	=	citrate de sodium/NaCl
STAT3	=	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
SVF	=	Sérum de Veau Fœtal
SVZ	=	<i>SubVentricularZone</i>
TCF/LEF	=	<i>(T cell factor)/(lymphoid enhancer family) transcription factors</i>
TGF α	=	<i>Transforming Growth Factor</i>
TLX	=	<i>Tailless homolog</i>
VEGF	=	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WNT	=	<i>Wingless-Int</i>
WT	=	<i>Wild Type</i>

.INTRODUCTION.

PARTIE I :
Les cellules souches.

I/ Le concept de cellules souches.

Les organismes pluricellulaires sont constitués de millions, voire de milliards de cellules, spécialisées en tissu et en organe. Le corps humain est ainsi composé de quelque cent mille milliards de cellules, réparties en plus de 200 types cellulaires différents. Tout comme le sang, de nombreux organes se renouvellent continuellement chez l'adulte ; les exemples les plus représentatifs du phénomène sont les épithéliums comme la peau et la paroi intestinale. Cette génération continue de nouvelles cellules permet de remplacer les cellules sénescents ou endommagées. Ce sont les troubles du contrôle de cette homéostasie cellulaire qui sont à l'origine de certaines maladies dégénératives ou de certains cancers.

Comme lors de l'embryogenèse, les cellules adultes néo-générées sont issues de cellules progénitrices, appelées cellules souches. Cette définition repose sur 3 critères : les cellules souches sont capables d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation. La division d'une cellule souche génère deux cellules-filles dont au moins une hérite de l'identité de cellule souche ; cette division sans modification du phénotype est l'auto-renouvellement. Si la seconde cellule-fille est une cellule de transition, dite déterminée, elle possède une capacité limitée de prolifération et sera à l'origine de cellules hautement différenciées. Elle permettra donc de générer les tissus spécialisés. Dans ce cas, on parle de division asymétrique qui génère un progéniteur multipotent qui va s'amplifier rapidement tout en réalisant le programme de différenciation du tissu concerné.

I.1/ Cellules souches embryonnaires, cellules souches adultes.

La cellule souche embryonnaire initiale est le zygote, capable de générer tous les types cellulaires, embryonnaires et extra-embryonnaires. Chez les mammifères, seul l'œuf fertilisé et les cellules issues des divisions très précoces (morula avant compaction) (*figure 1*) sont totipotents : ils produisent tous les types cellulaires des tissus et génèrent également les annexes embryonnaires comme le placenta et le cordon ombilical. Quand l'embryon atteint le stade blastocyste (*figure 1*), composé d'une centaine de cellules, deux types cellulaires apparaissent : la masse cellulaire interne, composée des cellules souches embryonnaires (ES), et les cellules du trophoblaste, à l'origine des annexes embryonnaires. Les cellules ES sont pluripotentes : elles sont à l'origine de tous les types cellulaires de l'embryon mais sont incapables de générer le trophoblaste (Burdon, 2002). Au fur et à mesure du développement embryonnaire, les cellules sont canalisées vers des voies de différenciation spécifiques et leur potentiel de développement se modifie (*figure 2*).

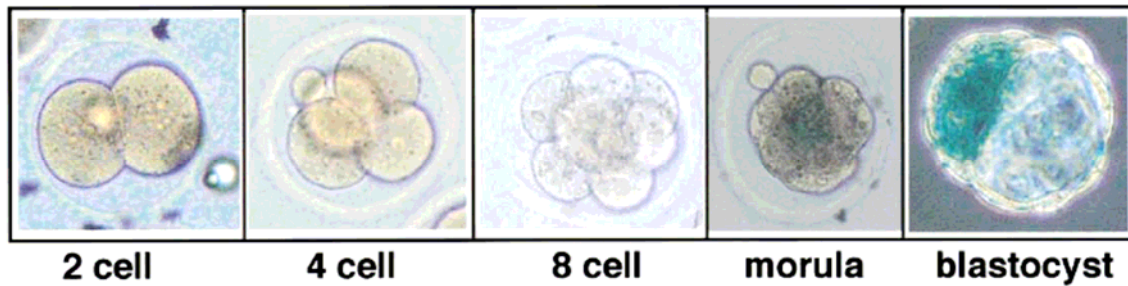


Figure 1 : Développement embryonnaire pré-implantatoire. (Mitsui, 2003)

La division successive des cellules issues de l'œuf fertilisé jusqu'au stade de morula (32 cellules) génère des cellules totipotentes à l'origine de l'embryon propre et les annexes extra-embryonnaires. Après compaction de la morula, la formation du blastocyste engendre les cellules du trophoctoderme, à l'origine des annexes embryonnaires, et une masse cellulaire interne constituée de cellules multipotentes. Ce sont les cellules souches embryonnaires, qui formeront l'embryon.

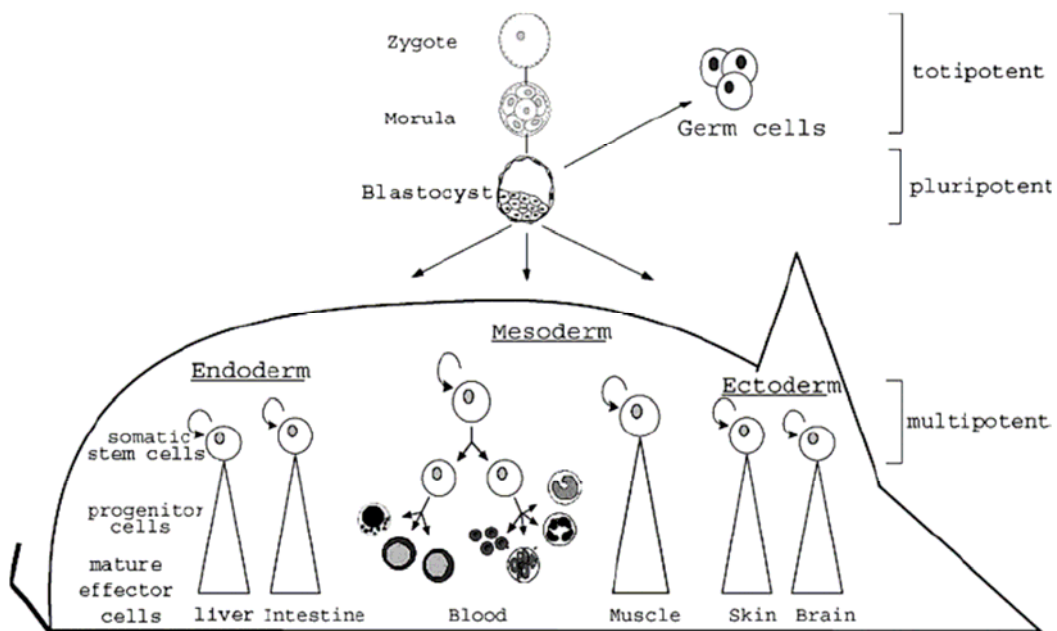


Figure 2 : Développement des cellules souches durant l'ontogenèse. (Avots, 2002)

Le développement de l'embryon de mammifère est schématisé du zygote aux stades de morula, blastocyste et embryon en gastrulation. Le corps de l'animal adulte est produit par trois feuilletts germinatifs différents (endo -, méso -, ectoderme) desquels sont originaires les différents systèmes cellulaires via les cellules souches somatiques, les cellules de transition (progéniteurs prolifératifs) et les effecteurs matures.

Les cellules souches existent également dans plusieurs tissus différenciés chez l'adulte, comme la moelle osseuse (Berardi, 1995 ; Krause, 2001 ; Reyes, 2001 ; Jiang, 2002a), la paroi intestinale (Potten & Hendry, 1983), la peau (Jones, 1995 ; Pellegrini, 2001), les muscles (Mauro, 1961 ; Bischoff, 1994 ; Chen & Goldhamer, 2003), l'œil (Tropepe, 2000), la dent (Gronthos, 2000) et le cerveau (Mc Kay, 1997 ; Temple & Alvarez-Buylla, 1999 ; Clarke, 2000). Ces cellules souches adultes se situent dans des « niches » offrant un environnement particulier (Fuchs & Segre, 2000 ; Spradling, 2001) (*figure 3*). La robustesse de ces niches est illustrée par l'isolation de cellules souches à partir de tissus *post-mortem* (Schwartz, 2003). Les cellules souches somatiques sont quiescentes mais peuvent générer des progéniteurs prolifératifs qui engendrent à leur tour des cellules spécialisées lors de l'homéostasie ou de la réparation tissulaires.

Au moment de leur découverte, les cellules souches somatiques ont été considérées comme incapables de générer d'autres types cellulaires que ceux dérivés du feuillet embryonnaire dont elles sont originaires. Néanmoins, la plasticité des cellules souches adultes est en réalité supérieure à celle supposée. Certaines cellules souches adultes ont non seulement conservé leur capacité d'auto-renouvellement, mais aussi leur pluripotence. Des cellules progénitrices adultes multipotentes qui se différencient en cellules endothéliales, et en cellules liées au lignage du (neuro)ectoderme et de l'endoderme ont ainsi pu être dérivées de l'épiderme (Toma, 2001), de la moelle osseuse, du tissu musculaire et du cerveau (Jiang, 2002b).

Les cellules souches hématopoïétiques ont la capacité de renouveler les cellules sanguines (capacité utilisée lors des greffes de moelle osseuse) mais génèrent également des cellules des 3 feuillets embryonnaires chez la souris : cellules pulmonaires, intestinales, épithéliales, cardiaques, de foie et de muscle squelettique (Krause, 2001). Cette extraordinaire plasticité semble être conservée chez l'Homme (Mezey, 2003). Il est également possible d'obtenir des cellules souches mésenchymateuses multipotentes à partir de moelle osseuse (Reyes, 2001 ; Jiang, 2002a). Cependant, il semblerait que la potentialité des cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses diminue avec l'âge du donneur (Geiger & Van Zant, 2002 ; Mendes, 2002 ; Bonab, 2006).

Les cellules souches neurales, longtemps considérées comme inexistantes, génèrent également des cellules différenciées de type cardiaque, musculaire, rénal, hépatique, pulmonaire, et intestinal (Clarke, 2000). Le schéma traditionnel d'une classification des cellules souches, et notamment de la spécificité tissulaire des cellules souches adultes, a ainsi été remis en question.

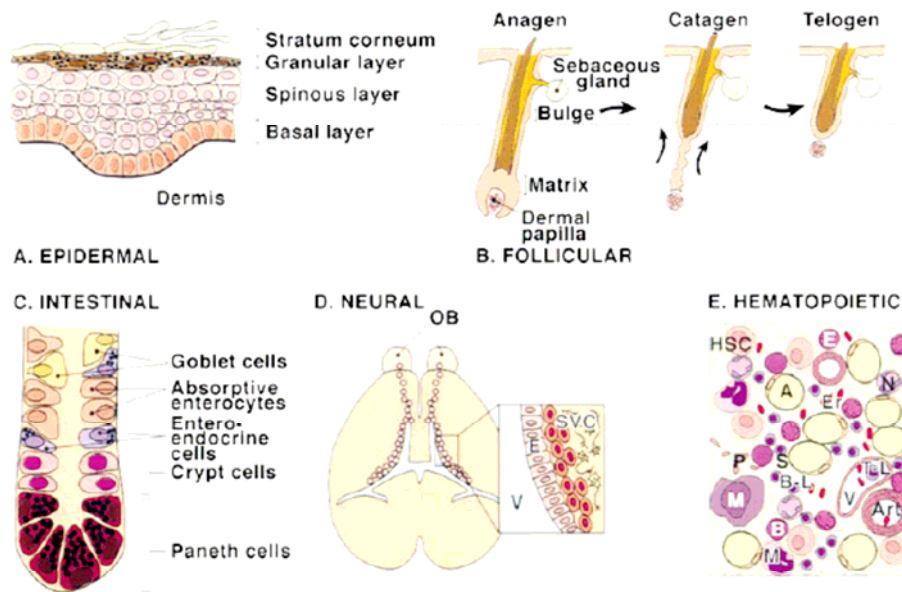


Figure 3 : Cellules souches adultes et environnement. (Fuchs & Segre, 2000)

(a) Dans l'épiderme non pileux, les cellules souches sont situées au sein de la couche cellulaire basale. La différenciation progressive donne naissance aux différents couches de l'épiderme, les cellules terminales, pigmentées, finissant par desquamer.

(b) Dans l'épiderme pileux, les cellules souches sont établies au niveau du « bulge » du follicule pileux, situé sous la glande sébacée qu'elles vont coloniser, ainsi que l'épiderme folliculaire, au dessus de la papille dermique. Leur migration bidirectionnelle permet de générer l'épiderme et le phanère (poil ou cheveu).

(c) Concernant l'épithélium intestinal, les cellule souches sont localisées au fond des cryptes, et résident au dessus des cellules de Paneth. Les progéniteurs, qui prolifèrent rapidement, occupent la partie supérieure de la crypte intestinale tandis que la villosité est composée de cellules différenciées, notamment les entérocytes, qui desquament à son apex.

(d) Les cellules souches neurales sont principalement localisées au niveau de la couche sous ventriculaire (SVC) qui borde les ventricules (V) latéraux (mais également au niveau de la couche sous granulaire du gyrus dente). Chez l'adulte, ces cellules, à l'origine d'astrocytes, d'oligodendrocytes et de neurones, migrent et colonisent les bulbes olfactifs (OB).

E : cellule épendymale.

(e) Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) situées dans la moelle osseuse se différencient en progéniteurs qui vont peu à peu s'engager vers un lignage. Les progéniteurs lymphoïdes donneront naissance aux lymphocytes T (T-L) et B (B-L), tandis que les progéniteurs myéloïdes produiront des basophiles (B), les éosinophiles (E), les neutrophiles (N), les macrophages, les plaquettes et les érythrocytes (Er).

A : adipocyte ; M : mégacaryocyte ; S : cellule stromale ; V : veine ; Art : artère.

En raison de leurs potentialités d'auto-renouvellement, de prolifération, de différenciation et de survie dans un environnement particulier, les cellules souches embryonnaires et adultes ont généré un domaine de recherche à la fois fondamental et médical. La compréhension des événements moléculaires contrôlant leur plasticité est essentiel au développement de la médecine régénératrice. L'utilisation des cellules souches embryonnaires, et des cellules souches/progénitrices adulte, permettent une meilleure compréhension de la biologie de développement humain, mais apportent également un grand espoir dans le traitement de maladies et des lésions. Ces thérapies cellulaires seraient indiquées dans les maladies dégénératives et dans la reconstruction d'organes lésés par des traitements tels que la chimiothérapie. Elles permettraient ainsi de fabriquer de la peau *ex-vivo* en cas de brûlures, de renforcer un cœur affaibli par un infarctus du myocarde, de repeupler des zones du cerveau en cours de dégénérescence dans des maladies comme Parkinson ou Alzheimer, de réparer la moelle épinière sectionnée, etc. La découverte de cellules souches capable de générer des cellules angiogéniques ou contractiles a ainsi permis de nouvelles options dans le traitement des cardiopathies : la transplantation de cellules souches et/ou progénitrices peut améliorer la perfusion tissulaire et les performances contractiles d'un cœur endommagé (Engelmann & Franz, 2006 ; van Laake, 2006).

De nombreux obstacles scientifiques et techniques sont à encore à franchir avant de pouvoir réellement utiliser la thérapie cellulaire en clinique (Pompe, 2005 ; Parson, 2006). Sur le principe, les thérapies cellulaires semblent relativement simples : il suffirait de transplanter au "bon endroit" et à une "dose" suffisante dans le corps du patient des cellules différenciées dérivées *in vitro* à partir de cellules souches embryonnaires, fœtales ou adultes. Cette approche est couronnée de succès dans le cas des greffes de moelle osseuse après éradication totale des cellules souches (malades) du donneur. Néanmoins, réussir à utiliser des cellules souches en thérapeutique relève du défi, les processus d'auto-renouvellement et de différenciation de ces cellules étant extrêmement complexes.

D'autre part, les lignées de cellules souches humaines disponibles, qu'elles soient embryonnaires ou adultes, sont rarement aptes à la thérapie cellulaire. En effet, de nombreuses lignées sont contaminées par divers pathogènes, notamment viraux, mais également par des molécules animales provenant du sérum ou des cellules nourricières (Martin, 2005). Par ailleurs, de nombreuses lignées sont sujettes au problème de sénescence (Bonab, 2006 ; Rando, 2006) et les cellules souches embryonnaires ont un fort potentiel tumorigénique (Robertson, 1987).

In vivo, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques permet la régénération hépatique par fusion des cellules transplantées avec les cellules endogènes (Vassilopoulos, 2003 ; Wang, 2003). Le même phénomène a lieu en cas de dommage cardiaque (Ishikawa, 2006). La fusion cellulaire intervient durant le développement – par exemples lors de la formation des ostéoclastes (Vignery, 2000) ou des myoblastes (Mintz & Baker, 1967) – et parfois lors de la progression tumorale et les phénomènes de métastase (Wiener, 1972 ; Kerbel, 1983). Dans le cadre de la thérapie cellulaire, la présence de cellules pluriploïdes risque d'être un problème de taille. Néanmoins, les cellules souches hématopoïétiques fusionnées aux cellules hépatiques de l'hôte réinitialisent leur expression génique et forment des hépatocytes phénotypiquement normaux qui prolifèrent et compensent le désordre métabolique du receveur (Vassilopoulos, 2003). Néanmoins, certains événements de trans-différenciation ne sont pas basés sur la fusion cellulaire. Par exemple, les cellules souches neurales après co-culture avec des cellules endothéliales se convertissent en cellules endothéliales sans événement fusionnel (Wurmser, 2004). Les cellules souches hématopoïétiques en co-culture avec du tissu hépatique lésé, séparé par une membrane poreuse, deviennent des cellules hépatiques (Jang, 2004). *In vivo*, elles produisent des cellules épithéliales dans le poumon, le foie et la peau, et ce sans fusion cellulaire (Harris, 2004). Enfin, les données disponibles suggèrent que la trans-différenciation de cellules souches endogènes est un événement rare en soi (Wagers & Weissman, 2004).

Enfin, les problèmes éthiques autour de l'utilisation des cellules souches embryonnaires ne sont pas négligeables puisque leur obtention implique la mort du fœtus (Thomson, 1998). Néanmoins, de récents travaux chez la souris ont permis de générer des lignées de cellules ES à partir d'un blastomère unique (Chung, 2006), blastomère que l'on obtient chez l'humain lors d'un diagnostic pré-implantatoire. Ceci n'entrave pas le potentiel de développement embryonnaire, ce qui règle le problème éthique de destruction de l'embryon donneur. Cette technique a été rapidement utilisée pour générer des lignées de cellules souches embryonnaires humaines (Klimanskaya, 2006), mais le procédé reste à être optimisé.

L'utilisation des cellules souches du sang de cordon ombilical pourrait être une alternative à l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines car elle règle le problème de la destruction de l'embryon. Ces cellules souches somatiques ont une plasticité proche de celle des cellules embryonnaires (Kögler, 2004) aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Elles sont cultivées en monocouche adhérente et ne sont donc pas contaminées par des cellules nourricières murines ; elles permettent de réaliser des auto-greffes, évitant l'incompatibilité tissulaire, et n'induisent pas de tumeur après transplantation.

La récente découverte dans le liquide amniotique humain d'une nouvelle source de cellules souches pluripotentes, les cellules AFS (*amniotic fluid-derived stem cells*), pourrait constituer une alternative d'accès aux cellules souches (De Coppi, 2007). Ces cellules expriment à la fois des gènes caractéristiques des cellules souches embryonnaires (Oct-4, SSEA-4 (*stage-specific embryonic antigen*)) et des cellules souches adultes (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105). Il est aisé de les isoler et de les cultiver et leur obtention ne nécessite pas la destruction d'un embryon. Ces cellules sont génétiquement et phénotypiquement stables après plusieurs centaines de divisions, et ne seraient pas tumorigéniques. Les cellules AFS sont multipotentes et génèrent des cellules différenciées fonctionnelles, dérivant des 3 feuillets embryonnaires : cellules musculaires, adipocytaires, osseuses, sanguines, nerveuses et hépatiques. Les cellules AFS dirigées *in vitro* vers un lignage cellulaire particulier peuvent produire des cellules spécialisées fonctionnelles après implantation *in vivo* (De Coppi, 2007) : leur injection au niveau du ventricule dans le cerveau permet d'obtenir une zone germinale secondaire ; leur injection sous-cutanée permet d'obtenir du tissu osseux. D'autre part, les cellules AFS sont maintenues indifférenciées en l'absence de cellules nourricières, éliminant ainsi tout problème de contamination.

Malgré l'intérêt majeur porté sur l'utilisation des cellules souches en thérapie, de multiples problèmes restent à résoudre. Les principaux concernent le contrôle de la prolifération, de la différenciation *in vitro* et *in vivo* ainsi que le ciblage correct vers le tissu désiré (Pompe, 2005). De nombreuses recherches concernant les processus impliqués dans la balance prolifération-différenciation sont requises avant que les thérapies cellulaires ne soient pertinentes.

I.2/ Plasticité cellulaire et épigénétisme.

Les modifications de la chromatine sont fondamentales à l'établissement et l'entretien des profils d'expression géniques spécifiques, qui constituent l'identité cellulaire. Chaque gène a un « épigénotype » défini par l'organisation de la chromatine selon le type de cellule et spécifique de l'étape du développement. Les facteurs de transcription se lient aux séquences de reconnaissance et recrutent des complexes multiprotéiques, tel que les facteurs de remodelage de la chromatine et de modification des histones, régulant l'accès de protéines régulatrices à l'ADN cible. Les histones peuvent être acétylées, méthylées et phosphorylées : ce « code des histones » définit les niveaux d'organisation de la chromatine et les activités géniques (Jenuwein & Allis, 2001). Les modifications de l'ADN et des histones sont transmis lors de la

division cellulaire et la propagation de l'état épigénétique de la chromatine à la génération cellulaire suivante est importante pour maintenir l'identité de cellules (Avots, 2002).

Dans les cellules souches embryonnaires et adultes, la différenciation est en partie contrôlée par les mécanismes épigénétiques, et la plasticité de différenciation est associée à l'accessibilité de la transcription de gènes (Lotem & Sachs, 2006). La diversité cellulaire est déterminée par l'activation ou la répression de l'expression génique pendant le développement (Reik, 2001 ; Surani, 2001). La transition des cellules souches d'un état pluripotent à un état de développement plus restreint est accompagnée par des changements globaux de l'expression des gènes. Les gènes actifs dans les progéniteurs les plus précoces sont progressivement réprimés au cours des stades de développement plus tardifs, et des sous-ensembles de gènes spécifiques d'un type cellulaire sont activés. Cette progression est le résultat d'expression sélective de facteurs de transcription en parallèle d'une modification et d'un remodelage de la chromatine qui inclut les modifications des histones, la méthylation de l'ADN au niveau des dinucléotides CpG, et la localisation de la chromatine dans des domaines nucléaires spécialisés (Li, 2002).

La multipotence d'une cellule souche tient non seulement dans sa capacité à produire différents lignages, mais également différents types cellulaires pour chacun des lignages. Par exemple, les cellules souches neurales engendrent trois lignées principales : les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones, majoritairement pendant le développement, bien qu'un grand nombre continue d'être généré au cours de la vie dans le cerveau mammifère adulte (Gage, 2000 ; Taupin & Gage, 2002 ; Lie, 2004). En plus de la spécification de lignage, beaucoup de types cellulaires différents de cellules sont produits dans chaque lignée. Par exemple, le lignage neuronal se répartit en neurones de Purkinje, granulaires, pyramidaux etc. Incomplètement comprise, cette diversité neuronale est supposée être gouvernée par une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux (Kempermann, 1997 ; van Praag, 1999).

La capacité des cellules souches adultes à générer des lignages différents de ceux dérivés du feuillet embryonnaire dont elles sont issues indique que le génome peut être « reprogrammé » par des mécanismes épigénétiques. Ces mécanismes activent la transcription de gènes qui sont exprimés dans des tissus différents de celui dont elles sont issues (Lotem & Sachs, 2006). Afin d'être reprogrammées vers un autre lignage, les cellules souches adultes d'un tissu donné doivent subir préalablement une abolition de leur « mémoire » épigénétique. Ainsi, il est possible de modifier l'identité de cellules souches neurales en altérant

l'épigénotype de ces cellules. Les cellules souches neurales traitées avec des agents chimiques (trichostatine A et 5-aza-20-déoxycytidine) qui changent le profil d'acétylation et de méthylation de la chromatine et de l'ADN sont alors capables d'hématopoïèse *in vivo* (Schmittwolf, 2005). Les cellules hématopoïétiques résultantes possèdent un caryotype diploïde, ce qui indique qu'elles n'ont pas été produites par un événement de fusion cellulaire (Schmittwolf, 2005).

Cette mémoire épigénétique permet aux cellules de maintenir leur identité, même si elles sont exposées à un environnement extracellulaire favorisant d'autres destins cellulaires, et est importante pour maintenir les cellules souches au cours du temps tout en empêchant l'apparition d'une tumeur (Valk-Lingbeek, 2004). Des processus épigénétiques interviennent de ce fait lors de l'évolution d'une cellule souche quiescente en un progéniteur prolifératif. L'une des caractéristiques des cellules souches est en effet leur capacité de se diviser ponctuellement dans un environnement où la plupart d'entre elles sont quiescentes. Les micro-ARN sont requis pour la division des cellules souches par inhibition d'un répresseur de l'activité des CDK (*cycline-dependant kinases*) de la famille p21/p27. Ceci suggère que les micro-ARN font partie des mécanismes épigénétiques permettant aux cellules souches d'être insensibles aux signaux de l'environnement bloquant le cycle cellulaire à la transition G1/S (Hatfield, 2005).

Le contrôle du devenir des cellules souches neurales implique également des mécanismes épigénétiques qui permettent la spécification des cellules en imposant un profil d'expression génétique héréditaire (Hsieh & Gage, 2004 ; Cheng, 2005). Ce contrôle épigénétique comprend notamment l'interaction des enzymes de remodelage de la chromatine avec les facteurs de transcription neurogéniques, le maintien de la stabilité du génome et la participation d'ARNs non codant dans la spécification du destin neural. La régulation de la spécification cellulaire et de la différenciation ou le maintien à un stade indifférencié requiert l'action de nombreux gènes, séquentiellement ou simultanément. Les mécanismes épigénétiques fournissent un moyen de coordonner l'activité et la répression d'un panel de gènes à des étapes spécifiques de la voie de différenciation. En plus de leur effet sur la spécification du destin neural, les changements dans le remodelage de la chromatine ont aussi été associés avec des changements de la plasticité neuronale et de la capacité de mémorisation, en induisant des changements rapides et transitoires dans l'expression génique. (Montarolo, 1986 ; Crosio, 2003).

Dans le télencéphale en développement, la neurogenèse a lieu avant la gliogenèse. L'activation du gène GFAP, exprimé dans les astrocytes, est bloquée dans les cellules neuroépithéliales (E11.5) aussi bien que dans les neurones post-mitotiques par méthylation de

l'ADN au niveau du site d'interaction avec STAT3 (Takizawa, 2001). À travers ce mécanisme, l'expression du gène GFAP est réprimée, même en cas d'activation de la voie de signalisation du LIF. A E14.5, l'ADN des cellules neuroépithéliales est déméthylé au niveau du site cible de STAT3, et de ce fait, les cellules deviennent sensibles au signal initié par le LIF. Ceci induit l'activation du gène GFAP et la différenciation en astrocyte. En plus des changements de méthylation de l'ADN, l'expression de la GFAP semble être contrôlé par plusieurs régulateurs transcriptionnels, comme N-CoR (*nuclear receptor corepressor*) et le récepteur nucléaire TLX (*Tailless homolog*) (Hermanson, 2002 ; Shi, 2004). Les cerveaux des souris NCoR *-/-* expriment la protéine GFAP de façon plus précoce, dès E14.5. N-CoR est donc impliqué dans la répression du gène GFAP et le contrôle de la différenciation des cellules souches neurales (Hermanson, 2002). D'autre part, les cellules souches neurales adultes isolées à partir de cerveau de souris TLX*-/-*, se différencient préférentiellement en astrocytes (Shi, 2004). Il existe donc plusieurs mécanismes qui permettent de restreindre spatialement et temporellement l'expression du gène GFAP, ce qui permet un contrôle très précis de la destinée des précurseurs.

L'inhibition des histone-déacétylases inhibe la différenciation des cellules ES (Lee, 2004) et la progression des progéniteurs d'oligodendrocytes vers le stade mature (Marin-Husstege, 2002). De plus, cette inhibition induit une différenciation neuronale des progéniteurs neurales adultes de l'hippocampe via l'induction de facteurs de transcription neurogéniques comme NeuroD, et inhibe la gliogenèse, même en conditions favorables à ce type de différenciation (Hsieh, 2004). Enfin, les progéniteurs d'oligodendrocytes peuvent être convertis en cellules souches neurales multipotentes *in vitro* en les cultivant successivement en présence de morphogènes de la famille BMP et de bFGF (Kondo & Raff, 2000). Ceci dépend de la réactivation de gènes exprimés dans les cellules souches neurales, tels que Sox2, et est dû au recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine sur le promoteur des gènes concernés, ainsi que des modifications post-traductionnelles des histones (Kondo & Raff, 2004).

II/ Les cellules souches embryonnaires.

La ségrégation des cellules en divers lignages commence lors de la compaction de la morula : les cellules internes vont alors former, au stade blastocyste, la masse cellulaire interne (*Inner cell mass*, ou ICM) tandis que les blastomères de la couche externe se différencieront en trophoblastes (Johnson & Ziomeck, 1981). Au stade 32 cellules, la cavité du blastocœle commence à se former. Les cellules de l'ICM en contact avec le blastocœle vont former l'endoderme primitif tandis que la vingtaine de cellules internes conservent leur pluripotence (Handyside, 1978). La masse cellulaire interne est composée d'une centaine de cellules lorsque le blastocyste s'implante *in vivo* dans la paroi utérine (nidation). Au moment de l'implantation, l'embryon est composé de trois types cellulaires distincts : le trophoctoderme, l'endoderme primitif et la masse cellulaire interne (Loebel, 2003 ; O'Shea, 2004) (*figure 4*). Le trophoctoderme et l'endoderme primitif seront à l'origine de la plupart des annexes embryonnaires (chorion, placenta) ; la masse cellulaire interne, organisée en un épithélium très prolifératif, l'épiblaste (Snow, 1977), générera les tissus embryonnaires et certains tissus extra-embryonnaires. Pendant la gastrulation, les cellules pluripotentes de l'épiblaste sont organisées en trois feuilletts germinatifs de l'embryon en développement (ectoderme, endoderme, mésoderme). Elles composent également le mésoderme extra-embryonnaire de l'amnion et du sac vitellin. Les feuilletts germinatifs embryonnaires sont à l'origine de tous les tissus fœtaux (Loebel, 2003 ; O'Shea, 2004).

Les caractéristiques des cellules souches embryonnaires (ES) sont la pluripotence et la capacité d'auto-renouvellement. Ces caractéristiques ont été largement étudiées dans les cellules souches embryonnaires murines. Ces cellules sont des lignées pluripotentes dérivées de la masse cellulaire interne des blastocystes (Evans, 1981 ; Martin, 1981), c'est à dire de l'embryon juste avant l'implantation. Lorsque que le zygote obtenu après fécondation est mis en culture, il peut se développer et générer un blastocyste. L'obtention d'une lignée de cellules souches embryonnaires est réalisée lors de l'expulsion de la masse cellulaire interne (ICM) hors de la zone pellucide. Cette ICM forme le bouton embryonnaire. Les cellules souches embryonnaires conservent leur capacité de pluripotence et expriment la télomérase, ce qui leur évite la sénescence. Elles participent, après réintroduction dans des blastocystes receveurs (Robertson, 1987), à la génération des divers lignages cellulaires, y compris les cellules germinales. Des mutations introduites dans le génome des cellules ES murines par recombinaison homologue permettent ainsi de générer des souris chimères qui pourront transmettre à leur descendance la mutation, ce qui permet de créer des lignées murines portant

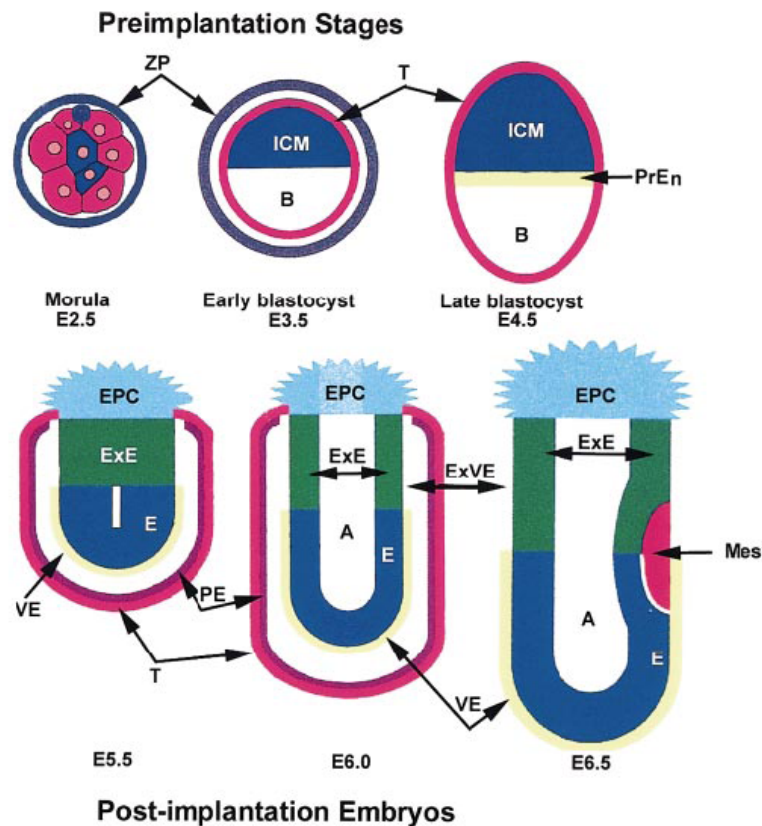


Figure 4 : Développement de l'embryon murin entre E2,5 et E5,5. (O'Shea, 2004)

Au stade de morula compactée (E2,5), les cellules internes sont destinées à former la masse cellulaire interne (ICM) au stade blastocyste (E3,5) tandis que les cellules externes se différencieront en trophoblastes (T). Dans le blastocyste tardif (E4,5), les cellules de l'ICM en contact avec le blastocœle (B) se différencient en endoderme primitif (PrEn). Celui génère après implantation (E5,5) l'endoderme viscéral (VE), en contact avec l'épiblaste (E) issu de la différenciation des cellules de l'ICM, et l'endoderme pariétal (PE), en contact avec les cellules trophoblastiques. A ce stade, la cavité proamniotique (A) commence à se former au sein de l'épiblaste. Le 3^{ème} feuillet, le mésoderme (Mes), se forme lors de la gastrulation à E6,5.

ZP : zone pellucide ; EPC : cône ectoplacentaire ; ExE : ectoderme extra-embryonnaire. ExVe : endoderme viscéral extra-embryonnaire.

une mutation génétique spécifique (Capecchi, 1989). Ainsi, l'utilisation de cellules ES dans lesquelles un allèle d'un gène est aboli par mutagenèse dirigée permet par croisement de générer des souris mutantes nullizygotes dites « KO » (*Knock-out*), essentielles pour l'étude fonctionnelle du gène d'intérêt.

Non seulement les cellules ES ont la propriété unique d'être multipotente *in vivo*, mais elles sont également capables de se différencier spontanément *in vitro* et peuvent générer divers lignages cellulaires liés aux trois feuilletts primitifs (endoderme, mésoderme et ectoderme) (Martin, 1981 ; Capecchi, 1989 ; Miller-Hance, 1993 ; Rohwedel, 1994 ; Bain, 1995). Cette différenciation *in vitro* procure un modèle puissant pour comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'engagement dans une voie de différenciation particulière. Le potentiel de développement des cellules ES portant des mutations dans un gène essentiel pour le développement embryonnaire peut être déterminé en culture. L'analyse de l'impact de ce type de mutation *in vivo* est en effet souvent compliquée par la mort prématurée de l'embryon *in utero*.

Les cellules ES murines sont maintenues en culture dans un état indifférencié et totipotent en présence de fibroblastes embryonnaires, traités pour ne plus se diviser (irradiation ou traitement à la mitomycine) et servant de cellules nourricières (« *feeders* »), et/ou de LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) (Williams, 1988). En l'absence de cellules nourricières et/ou de LIF, et en conditions de culture non-adhésives (milieu liquide, semi-solide (méthyl-cellulose), ou en gouttes pendantes) les cellules ES se différencient spontanément. Dans ces conditions, elles génèrent des agrégats cellulaires sphériques et différenciés, appelés corps embryoïdes ou embryonnaires (EB). La couche cellulaire externe de ces structures correspond à de l'endoderme viscéral (Doetschman, 1985). Les corps embryoïdes générés peuvent être étudiés à divers stades de leur développement et la présence de populations cellulaires spécifiques analysée.

Pour être utilisées en thérapie cellulaire, les cellules souches embryonnaires doivent être capables de contribuer à la fonction du tissu cible, ce qui est possible en contrôlant leur différenciation *in vitro* jusqu'au stade de précurseur. Les cellules transplantées doivent également être exemptes de toute cellule indifférenciée qui pourrait être à l'origine de la formation de tumeur de type tératocarcinome (Robertson, 1987). Dans l'embryon, une cellule multipotente engagée dans une voie de différenciation répond à des signaux inducteurs et inhibiteurs provenant des tissus environnants. La restriction du potentiel de différenciation et l'activation des gènes spécifiques d'un lignage sont influencées par les interactions cellulaires

et la signalisation médiée par des facteurs extracellulaires de la famille des FGF, de la famille du TGF β (et plus particulièrement les BMP) ainsi que ceux de la famille Wnt (Loebel, 2003 ; O'Shea, 2004).

La reproduction des conditions embryonnaires *in vitro* peut être réalisée en ajoutant au milieu de culture une combinaison de molécules appropriée afin de diriger la différenciation des cellules ES dans un lignage particulier. De nombreux efforts ont donc été réalisés pour comprendre les mécanismes intervenant dans la maintenance de l'état totipotent et des voies de signalisation contrôlant la spécification cellulaire. Cette compréhension, essentielle pour contrôler la différenciation des cellules ES, passe par une connaissance approfondie des processus intervenant chez l'embryon, *in vivo*.

II.1/ L'auto-renouvellement et le maintien de l'état indifférencié des cellules ES.

L'auto-renouvellement des cellules ES est régulée par différentes cytokines et facteurs de croissance modulant les voies de signalisation dépendant des tyrosine-kinases, notamment celle de la famille des JAK et SRC (Hirano, 2000).

En culture, les cellules ES murines sont maintenues indifférenciées par la présence de LIF, une cytokine de la famille de l'interleukine 6 (IL-6) qui agit via la partie canonique de son récepteur, la sous-unité Gp130. L'engagement de cette sous-unité fournit la voie majeure maintenant l'auto-renouvellement des cellules ES murines en culture, et permet également de maintenir leur pluripotence ainsi que leur capacité à coloniser un embryon afin de générer un animal chimérique (Smith, 2001). L'action du LIF active la voie JAK/STAT dont Stat3 est la principale composante (Raz, 1999). L'association du récepteur au LIF avec la sous-unité Gp130 permet l'activation des kinases JAK associées. Celles-ci phosphorylent STAT3, induisant sa dimérisation. Les dimères de STAT3 se délocalisent alors dans le noyau où ils contrôlent la transcription de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement (Burdon, 2002) (*figure 5*).

La voie des MAP-kinases Ras-Erk, est également stimulée par LIF-Gp130 et est antagoniste de l'auto-renouvellement des cellules ES par un contrôle négatif de l'activité JAK (Burdon, 1999 ; Schmitz, 2000). L'expression de STAT3 semble être nécessaire et suffisante pour l'auto-renouvellement des cellules ES (Niwa, 1998 ; Matsuda, 1999), mais la présence de sérum dans les études peut masquer l'implication d'autres molécules. D'autre part, l'auto-renouvellement des cellules ES humaines est indépendant de la présence de LIF dans le milieu de culture (Thomson, 1998 ; Smith, 2001). De récents travaux ont montré que Noggin et bFGF coopèrent pour maintenir les cellules ES humaines dans un état indifférencié, en l'absence de

cellules nourricières (Wang, 2005a). Les cellules ES humaines et murines exprimeraient des récepteurs membranaires différents, mais les voies cytoplasmiques, telle que JAK/STAT semblent être conservées (Rose-John, 2002).

D'autres facteurs de croissance contenus dans le sérum et/ou produits par la couche de fibroblastes nourriciers, ainsi que par les cellules ES elles-même, pourraient contribuer au maintien de l'état indifférencié et de l'auto-renouvellement.

En condition de culture sans sérum, le LIF est en effet insuffisant pour inhiber la différenciation neurale des cellules ES. BMP4 est alors requis pour supprimer cette différenciation et rétablir un auto-renouvellement efficace (Ying, 2003) (**figure 5**). BMP4 se lie à un récepteur membranaire de la famille du TGF β , ALK2, 3 ou 6. Le signal est transmis après phosphorylation des facteurs Smad1, 5 et 8 qui hétéro-dimérisent avec le facteur Smad4 avant de se localiser dans le noyau et induire l'expression des protéines Id (*Inhibitor of Differentiation*) (Miyazawa, 2002 ; Ying, 2003). Les protéines Id inhibent l'action des facteurs de transcription bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*), tels que Mash1, qui déterminent la différenciation neurale des cellules ES (Ying, 2003).

La voie Wnt est également impliquée dans l'auto-renouvellement des cellules ES (Sato, 2004) et l'inhibition de différents acteurs de la voie de signalisation a montré son implication dans la différenciation neurale (O'Shea, 2004). La voie de signalisation Wnt/ β -caténine induit l'expression de STAT3, mais en absence de sérum ou de LIF, elle est incapable d'inhiber la différenciation des cellules ES. La synergie avec la voie contrôlée par le LIF permet donc de maintenir les cellules ES dans un état indifférencié (Hao, 2006) (**figure 5**).

La famille des kinase Src est également impliquée dans le maintien de l'auto-renouvellement des cellules ES, en participant à la signalisation LIF/Gp130 (Ernst, 1994) mais de façon indépendante aux voies JAK/STAT3 et MAPK (Anneren, 2004). L'inhibition spécifique partielle de la voie Src induit une différenciation des cellules ES murines en présence du LIF (Anneren, 2004 ; Meyn, 2005) tandis que la suppression complète de l'activité des membres de la famille Src bloque la différenciation des cellules lors du retrait du LIF et permet également le maintien de l'état indifférencié des cellules malgré l'absence de la cytokine (Meyn, 2005). Ceci implique que les différents membres de la famille Src agissent différemment sur les voies contrôlant l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches embryonnaires (**figure 6**). De précédents travaux ont montré l'implication de la voie Src vis-à-vis de l'induction mésodermique par le FGF lors de l'embryogenèse (Weinstein, 1998).

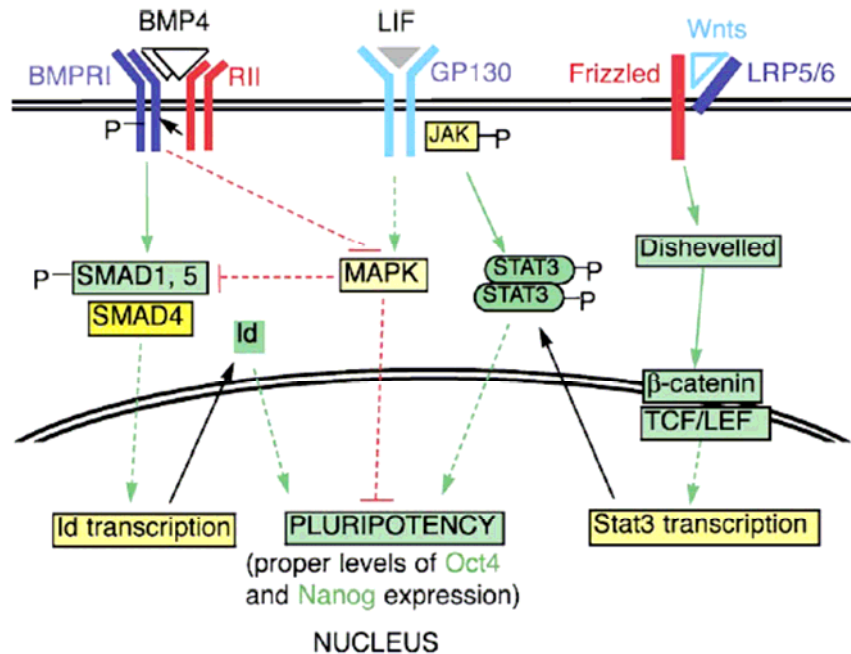


Figure 5 : Synergie d'action de BMP4, du LIF, et des membres de la famille WNT, dans le maintien de l'état indifférencié des cellules ES murines. (Hao, 2006)

La liaison de BMP4 à son récepteur induit la phosphorylation de SMAD1 et SMAD5 qui forment alors un complexe avec SMAD4. Le dimère ainsi formé se relocalise dans le noyau et induit l'expression des gènes Id (Ying, 2003). Le signal induit par BMP4 inhibe également les MAP kinases ERK et p38 kinases dans les cellules ES murines (Qi, 2004), qui sont capables de phosphoryler les SMADs dans le domaine de dimérisation, ce qui empêche leur import nucléaire (Pera, 2003). La liaison du LIF à son récepteur induit l'activation des kinases JAK par la sous-unité GP130. La phosphorylation de STAT3 par JAK lui permet d'agir comme facteur de transcription pour le maintien de l'état indifférencié (Smith, 2001). La signalisation induite par le LIF active également la voie ERK-MAPK qui entraîne la différenciation des cellules ES. Cet effet est inhibé par la voie de signalisation BMP4-dépendante. Les protéines de la famille WNT se lient aux complexes formés des récepteurs Frizzled et des protéines LRP5/6 (*low density lipoprotein receptor-related protein 5/6*). L'activation de la voie WNT entraîne l'accumulation de la β -caténine qui interagit alors dans le noyau avec les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (*T cell factor / lymphoid enhancer family - transcription factors*) afin de stimuler la transcription du gène Stat3.

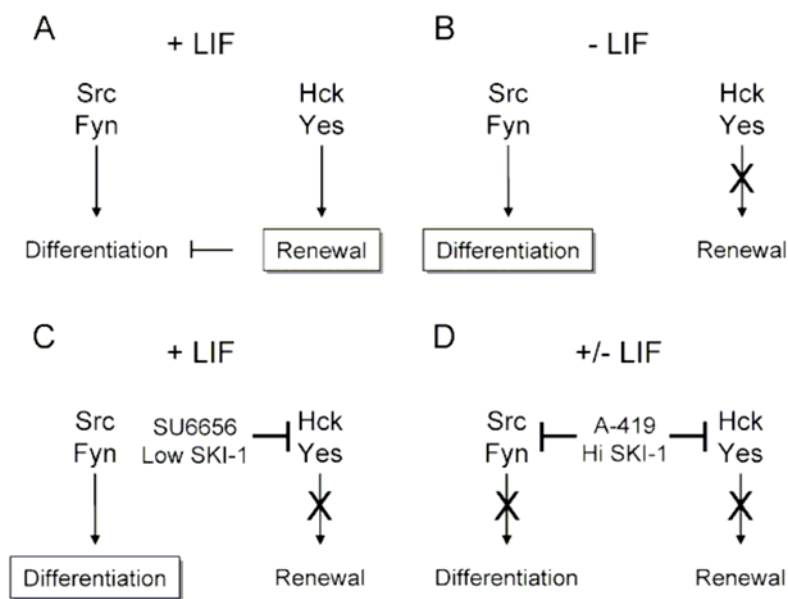


Figure 6 : Régulation du devenir des cellules ES par les Src kinases. (Meyn, 2005)

A) Les protéines de la famille Src régulent au moins deux voies de signalisation indépendantes dans les cellules ES. La première favorise l'auto-renouvellement en présence de LIF et inclurait Hck et Yes. La deuxième voie contribue à la croissance et la différenciation des cellules ES et inclurait Src et Fyn. Quand les deux voies sont actives dans les cellules ES en division, la voie de signalisation impliquée dans l'auto-renouvellement domine et inhibe la différenciation, ce qui permet l'expansion de la population cellulaire.

B) Le retrait du LIF induit une rapide perte d'expression de Hck et des autres signaux nécessaires à l'auto-renouvellement, ce qui permet l'initiation du programme de différenciation.

C) L'inhibition des kinases liées à l'auto-renouvellement, telles que Hck et Yes, par la molécule SU6656 (compétitrice de l'ATP, qui n'inhibe pas tous les membres de la famille Src) ou par de basses concentrations de SKI-1 (*Src Kinase Inhibitor-1*, inhibiteur compétitif de l'ATP à plus large spectre d'action) induit la différenciation des cellules ES malgré la présence de LIF. Ceci suppose que les signaux de différenciation sont présents dans les cellules ES qui s'auto-renouvellent, mais sont réprimés par des signaux d'auto-renouvellement dépendants de certains membres de la famille Src (Hck, Yes) et indépendants de Stat3.

D) L'inhibition de l'ensemble des membres de la famille Src (impliqués dans l'auto-renouvellement ou la différenciation) par l'antagoniste A-419 rend les cellules ES incapables de se différencier en réponse au retrait de LIF. Ces cellules prolifèrent lentement et conservent les caractéristiques de cellules pluripotentes.

Un nombre restreint de facteurs de transcription joue un rôle dans le maintien de l'auto-renouvellement et du maintien de l'état indifférencié des cellules ES, et la plupart sont dépendants de la voie Gp130/Stat3.

Le facteur de transcription à homéodomaine, Oct3/4 (codé par le gène *Pou5f1*) est un régulateur essentiel du développement embryonnaire pré-implantatoire (*figures 7 et 8*). Il est exprimé par les cellules totipotentes telles que le zygote, les cellules de l'épiblaste (ICM), l'ectoderme primitif, les cellules ES et les cellules de la lignée germinales (Pesce, 2001 ; Niwa 2000 ; 2001). Oct3/4 est essentiel à la formation de l'ICM *in vivo* (Nichols, 1998) tandis que la différenciation de l'épiblaste est accompagnée par la répression du gène *Pou5f1*. Néanmoins, son expression constitutive n'empêche pas la différenciation des cellules ES après retrait du LIF, sa surexpression induisant même cette différenciation (Niwa, 2001). L'inhibition de Oct3/4 induit la différenciation des cellules ES en trophoctoderme, alors que sa sur-expression stimule la différenciation en endoderme extra-embryonnaire, ce qui indique qu'un niveau approprié (« *gene dosage effect* ») du facteur de transcription est requis pour le maintien de l'état indifférencié (Niwa, 2000). De récentes études ont démontrées que Oct3/4 joue un rôle dans la différenciation neuronale de cellules ES (Schimozaki, 2003). En condition de culture sans sérum ni LIF, la surexpression du facteur de transcription induit une différenciation neurectodermique des cellules ES, probablement via l'induction de l'expression de certains facteurs pro-neuraux.

Oct3/4 agit comme un activateur ou un répresseur de transcription selon la présence de co-facteurs (Niwa, 2001), notamment Sox2, qui agit en tant que co-activateur (Ambrosetti, 1997). Les défauts de développement des embryons dont le gène *Sox2* a été invalidé suggèrent que Sox2 est important pour une spécification correcte de l'épiblaste comme de l'endoderme primitif et du trophoctoderme (Avilion, 2003). L'expression de Sox2 perdure dans la plaque neurale et se réduit ensuite aux cellules souches neurales, intestinales et germinales (Graham, 2003). Récemment, le rôle de Sox2 a été élucidé. Les cellules ES *Sox2*^{-/-} se différencient en trophoctoderme, et cette différenciation est due à une diminution de l'expression de Oct3/4. Le maintien artificiel de l'expression d'Oct3/4, par transfection du gène *Pou5f1*, rétablit la pluripotence des cellules ES *Sox2*^{-/-} (Masui, 2007). Sox2 est nécessaire à la régulation de multiples facteurs de transcription qui affectent l'expression d'Oct3/4. Sa fonction principale est donc de maintenir l'état pluripotent des cellules ES en maintenant le niveau d'expression requis de Oct3/4 (Masui, 2007).

Une autre protéine à homéodomaine, Nanog, est également requise afin que les cellules ES conservent leur pluripotence (*figures 7 et 8*) ; ce facteur de transcription agit par répression

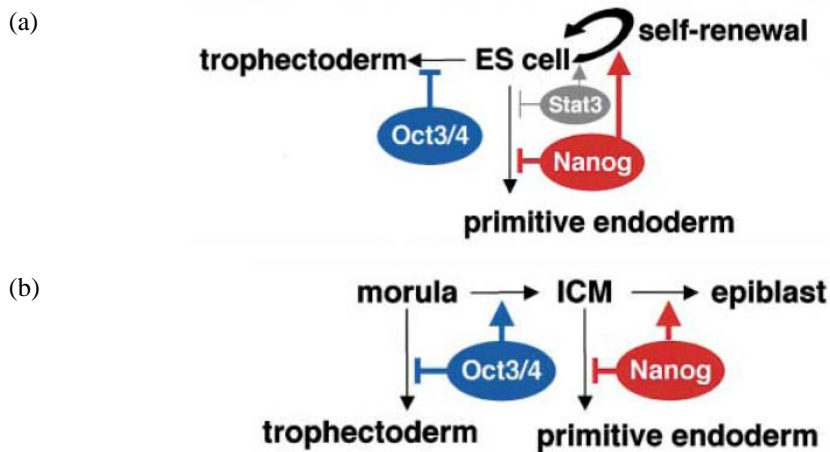


Figure 7 : Rôles des protéines Oct-3/4, Nanog et STAT3. (Mitsui, 2003)

(a) Avant implantation, Oct-3/4 inhibe la différenciation des cellules internes de la morula en trophoblaste et permet donc la constitution de la masse cellulaire interne (ICM) du blastocyste. A ce stade, Nanog inhibe la différenciation endodermique et permet la génération de l'épiblaste.

(b) Dans les cellules ES, Oct-3/4 inhibe la différenciation trophoblastique tandis que Nanog et STAT3 inhibent la spécialisation endodermique et favorisent l'auto-renouvellement cellulaire.

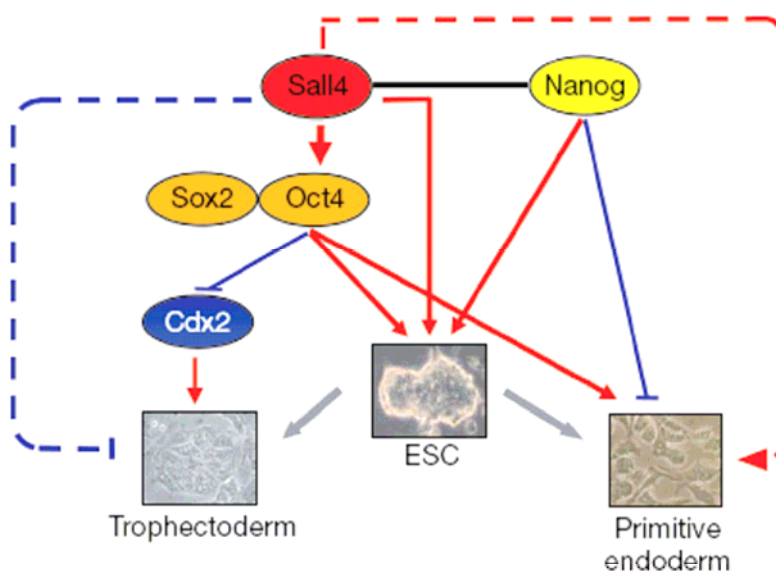


Figure 8 : Action concertée de Sall4, Oct4 et Nanog chez l'embryon murin précoce pour contrôler le destin des cellules ES. (Zhang, 2006)

Sall4, Oct4 et Nanog sont indispensables pour l'auto-renouvellement des cellules ES. Sall4 régule directement l'expression de Oct4. L'absence de Sall4 ou Oct4 cause la différenciation en trophoblaste. Oct4 inhibe l'expression du marqueur Cdx2, indispensable pour le lignage trophoblastique (Strumpf, 2005 ; Tolkunova, 2006). La surexpression d'Oct4 induit la différenciation en endoderme primitif. La différenciation (induite par retrait du LIF ou addition d'acide rétinoïque) des cellules ES sur-exprimant Sall4 conduit à un enrichissement spécifique de l'expression de marqueurs de l'endoderme primitif tel que Gata4, Gata6 et Sox17. Enfin, de récentes études ont montré que Sall4 est un partenaire de Nanog (Wu, 2006).

de gènes induisant la différenciation et est indépendant de la voie LIF/Stat3 (Mitsui, 2003 ; Chambers, 2003). Nanog est détecté dans les cellules de l'ICM *in vivo* et dans les cellules ES dérivées, ainsi que dans les cellules germinales précoces. Les cellules ES n'exprimant pas Nanog perdent leur capacité de pluripotence et se différencient en endoderme extra-embryonnaire tandis que *in vivo*, Nanog est essentielle à la génération de l'épiblaste (Mitsui, 2003). La surexpression de Nanog libère les cellules ES de leur dépendance à la signalisation LIF/Gp130 et réduit la différenciation induite par l'acide rétinoïque (Chambers, 2003).

Sall4, régulateur transcriptionnel de *Pou5f1*, est également requis pour le maintien des cellules ES (**figure 8**). Une diminution du niveau d'expression de Sall4 entraîne une re-spécification en trophoblaste tandis que sa surexpression génère de l'endoderme primitif (Zhang, 2006). Sall4 et Nanog interagissent et exercent leur activité transcriptionnelle modulatrice en synergie (Wu, 2006).

Enfin, la signalisation par le récepteur Notch jouerait également un rôle dans l'auto-renouvellement des cellules souches (Androutsellis-Theotokis, 2006). L'activation du récepteur induit l'expression de Shh après l'activation cytoplasmique de la sérine-thréonine kinase Akt et du facteur STAT3.

II.2/ La différenciation des cellules souches embryonnaires.

Les corps embryoïdes précoces contiennent des cellules exprimant des marqueurs spécifiques de l'endoderme primitif et du mésoderme (Martin, 1981 ; Robertson, 1987). Ainsi, les corps embryoïdes formés lors de la différenciation des cellules ES *in vitro* miment la formation des tissus embryonnaires post-implantatoires. Après 8 à 10 jours en culture, les corps embryoïdes génèrent des cellules hématopoïétiques (Schmitt, 1991 ; Keller, 1993 ; Pacacios, 1995), endothéliales (Vittet, 1996), musculaires (Miller-Hance, 1993 ; Rohwedel, 1994), cardiaques (Maltsev, 1993), adipocytaires (Dani, 1997) et neuronales (Bain, 1995). Les capacités de différenciation ainsi que le profil d'expression génique des corps embryoïdes récapitulent la cinétique d'apparition des tissus (et des marqueurs associés) de l'embryon au stade post-implantatoire précoce (Leahy, 1999).

Le système des corps embryoïdes permet d'étudier la fonction de gènes dans le développement précoce de façon complémentaire aux analyses faites chez l'animal. D'une part, les défauts observés dans les corps embryoïdes sont similaires à ceux trouvés *in vivo* ; d'autre part, l'accès aisé *in vitro* aux populations se développant précocement permet une caractérisation plus précise du défaut observé (pour exemple, voir Weiss, 1994), notamment lorsque la protéine maternelle masque le phénotype avant l'implantation. Ainsi, l'intérêt de ce

modèle passe par l'isolation des précurseurs précoces, limités à un lignage particulier. L'accès à de telles populations permet de compléter leur caractérisation, d'identifier les facteurs impliqués dans leur croissance et leur différenciation, et d'élucider les événements moléculaires impliqués dans leur établissement.

De même, les corps embryoides issus de cellules ES dans lesquelles les deux allèles d'un gène ont été abolis par mutagenèse dirigée représentent souvent une alternative intéressante pour étudier l'impact de la délétion du gène, notamment lorsque le phénotype résultant est une mort précoce de l'embryon (pour exemple, voir Vittet, 1997).

En plus de leur intérêt en recherche fondamentale, le potentiel des corps embryoides a pris toute son importance lors de la génération de lignées de cellules souches embryonnaires humaines (Thomson, 1998). Les applications cliniques qui en découlent, comme le remplacement de populations cellulaires, voire de tissus, non seulement en cas de lésions, mais également après chimiothérapie ou dans le cas de maladies dégénératives (Solter, 1999 ; Vogel 1999) ont apporté de grands espoirs en médecine régénératrice. Cependant, deux obstacles essentiels doivent être surmontés : l'obtention de populations cellulaires (différenciées ou précurseurs) homogènes, et la neutralisation du potentiel tumorigénique des cellules ES. En effet, l'injection sous-cutanée de cellules ES chez des souris immunodéficientes conduit à la formation d'un tératocarcinome, composé de plusieurs types cellulaires différenciés tels que de l'épithélium, du tissu neural et conjonctif, ainsi que de cellules indifférenciées (Robertson, 1987).

Malgré la difficulté d'obtention de populations homogènes, des dérivés fonctionnels des trois feuilletts embryonnaires ont été produits et ont pu être transplantés chez des animaux. Des essais réussis ont été réalisés sur des animaux diabétiques (Lumelsky, 2001), ou présentant un phénotype de la maladie de Parkinson (Nishimura, 2003).

La plupart des lignées cellulaires apparaissent en milieu de culture supplémenté seulement par du sérum de veau fœtal ; néanmoins, la génération efficace de cellules neurales à partir des corps embryoides nécessite un traitement par l'acide rétinoïque (Bain, 1995). Ce morphogène est classiquement utilisé pour induire la différenciation neurale des cellules ES en culture et des corps embryoides (Brustle, 1998 ; 1999 ; Gottlieb, 2002 ; Muñoz-Sanjuán, 2002), même si ses mécanismes d'action ne sont pas exactement élucidés. *In vivo*, l'acide rétinoïque est essentiel à la spécification neuronale le long de l'axe rostro-caudal du cerveau en développement (Czyz, 2001).

Au cours du développement, la différenciation neurale débute par celle de l'ectoderme primitif dorsal en neurectoderme. Les cellules sont alors orientées vers un destin neural par l'inhibition des voies de signalisation dépendantes de facteurs de la famille du TGF β , notamment des BMP. Cette inhibition passe par la libération de molécules inhibitrices telles que Noggin et Chordin par l'ectoderme ventral (Stern, 2005). *In vitro*, les cellules ES sont spécifiées en cellules proneurales selon des mécanismes comparables au développement du cerveau embryonnaire (Cazillis, 2006) (**figure 9**).

In vivo, BMP4 induit par son action directe la différenciation épidermique, tandis que tout événement l'inhibant conduit à la détermination du neurectoderme (Panchision, 2002). L'inhibition de BMP4 a lieu soit au niveau de la voie de signalisation qu'il régule, soit au niveau de l'effet transcriptionnel qui en découle. Cet effet est régulé par les effets croisés de la signalisation de WNT et des FGF (Wilson, 2001). En effet, les facteurs sécrétés Noggin et Chordin, inhibiteurs de BMP4, voient leur expression respective régulée par Wnt et FGF. La signalisation liée aux facteurs WNT intervient également dans la différenciation *in vitro*. Cette voie de signalisation aboutit classiquement à l'accumulation nucléaire de β -caténine et à la transactivation de gènes cibles. L'inhibition de la voie dans les cellules ES stimule la différenciation neurale (Aubert, 2002 ; Kielman, 2002) tandis que son activation augmente l'expression de BMP4 et BMP7, inhibiteurs spécifiques de la différenciation neurale (Otero, 2004).

Les cytokines de la famille du FGF, et notamment FGF4 qui induit l'expression de marqueurs neuraux, ne sont pas nécessaires à la différenciation des cellules ES en culture. Si leur présence assure la prolifération des cellules en différenciation, leur défaut induit la différenciation neurale (Ying, 2003 ; O'Shea, 2004).

Le signal Hedgehog est essentiel à la différenciation des cellules ES en neurectoderme en réponse à l'acide rétinoïque. Les corps embryoides cultivés en présence d'un inhibiteur de la voie Hedgehog, ou dérivés des cellules ES nullizygotes pour *Ihh* ou *Smo*, composants de la voie Hedgehog, sont en effet incapables de répondre au traitement à l'acide rétinoïque et de générer des cellules souches neurales, exprimant le marqueur Nestine (Maye, 2004).

Enfin, l'acide rétinoïque, produit localement dans le cerveau embryonnaire et dont l'action est partiellement dépendante de la voie de signalisation de Wnt et des FGF, est requis pour établir la spécification neurale (Muñoz-Sanjuán, 2002). L'acide rétinoïque est produit le long de l'axe rostrocaudal du cerveau embryonnaire où il intervient dans le patron des territoires des cellules précurseurs (Czyz, 2001 ; Cazillis, 2006) (**figure 10**). De plus, en

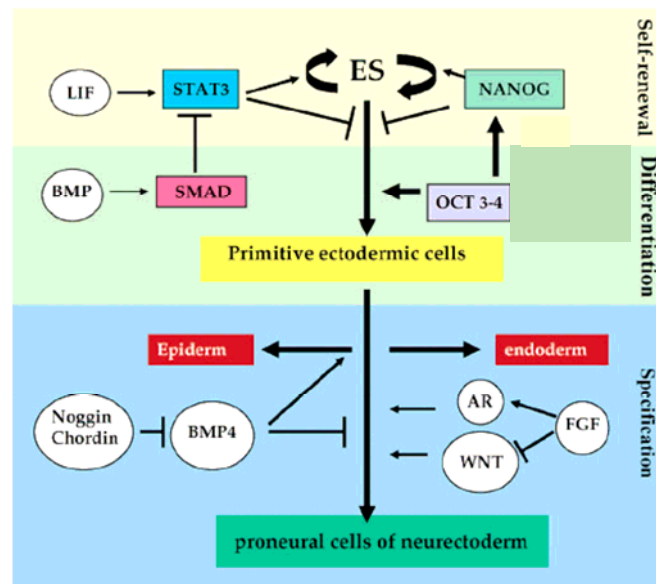


Figure 9 : Spécification des cellules ES en cellules du neuroectoderme. (Cazillis, 2006)

Comme précédemment décrit, l'auto-renouvellement et la prolifération des cellules ES est assurée par le facteur soluble LIF, via l'activation de STAT3. BMP active les facteurs SMAD, qui inactivent STAT3. NANOG intervient quant à lui en activant la prolifération des cellules ES et en inhibant leur différenciation. En absence de LIF, l'inactivation de STAT3 induit la différenciation des cellules ES en cellules de l'ectoderme primitif. En parallèle, OCT4, à une concentration basale, stimule l'auto-renouvellement. Par contre, des taux élevés d'OCT4 induisent la différenciation des cellules ES en cellules de l'ectoderme primitif. L'inhibition de BMP4 par les inhibiteurs Noggin et Chordin, induit la spécification neurale par défaut, au détriment de la différenciation épidermique. L'acide rétinoïque (RA) et la voie de signalisation répondant aux membres de la famille WNT activent la différenciation des cellules de l'ectoderme en neuroectoderme (cellules pro-neurales, ou cellules souches neurales). La voie de signalisation dépendante du FGF inhibe le signal provoqué en réponse aux facteurs WNT et active celui modulé par l'acide rétinoïque.

réprimant la voie de signalisation par FGF, il lève l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine et active en cascade l'expression de gènes permettant la différenciation neuronale (Cazillis, 2006). *In vitro*, les cellules ES produisent BMP2 et BMP4 en concentrations très faibles, ainsi que les antagonistes Noggin et Chordin. Elles acquièrent un phénotype neural en l'absence de BMP4 exogène, ce qui suggère un mécanisme par défaut (Tropepe, 2001). L'addition de Noggin ou Chordin au milieu de culture entraîne alors une augmentation du nombre de colonies différenciées. L'inhibition de BMP4 induit la différenciation neurale dans les cellules ES. Cette action de BMP4 vis-à-vis de la différenciation des ES semble limitée dans le temps, de façon à coïncider avec son effet sur la gastrulation précoce de l'embryon (O'Shea, 2004).

In vitro, l'acide rétinoïque est associé à la différenciation précoce des cellules ES dans les corps embryoides, tout comme il intervient dans la spécification des cellules souches neurales dans l'embryon : selon la concentration de morphogène utilisé, la spécification neurale varie (Wichterle, 2002 ; Mizuseki, 2003 ; Okada, 2004), reproduisant la différenciation spatio-temporelle de cellules au cours du développement embryonnaire. L'acide rétinoïque agit en synergie avec SHH et BMP4, leur concentration relative permettant la spécification des cellules ES (Cazillis, 2006) (**figure 10**). L'absence d'acide rétinoïque dans le milieu de culture induit la différenciation des cellules ES en cellules exprimant des marqueurs de cerveau antérieur (moto-neurones du télencéphale). Les cellules ES se différencient en neurones exprimant des marqueurs du cerveau moyen pour des doses faibles d'acide rétinoïque (Okada, 2004). L'addition graduelle de morphogène permet d'obtenir différentes populations neuronales de façon parallèle aux populations trouvées *in vivo* le long de l'axe antéro-postérieur. L'action caudalisante de l'acide rétinoïque (apparition des marqueurs postérieurs) se combine aux effets de SHH pour obtenir des moto-neurones de la moelle épinière (Wichterle, 2002). Enfin, de fortes concentrations d'acide rétinoïque (5 μ M) permet d'obtenir les cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes).

Dans certaines conditions de culture, les cellules ES se différencient en cellules gliales (Brustle, 1999) : après génération de corps embryoides, les cellules sont dissociées et cultivées en conditions non adhésives en présence de FGF2 et EGF, éventuellement de PDGF. Les facteurs EGF et FGF2 favorisent la prolifération des précurseurs neuraux issus des cellules ES tandis que le PDGF permet une différenciation gliale terminale (McKay, 1997).

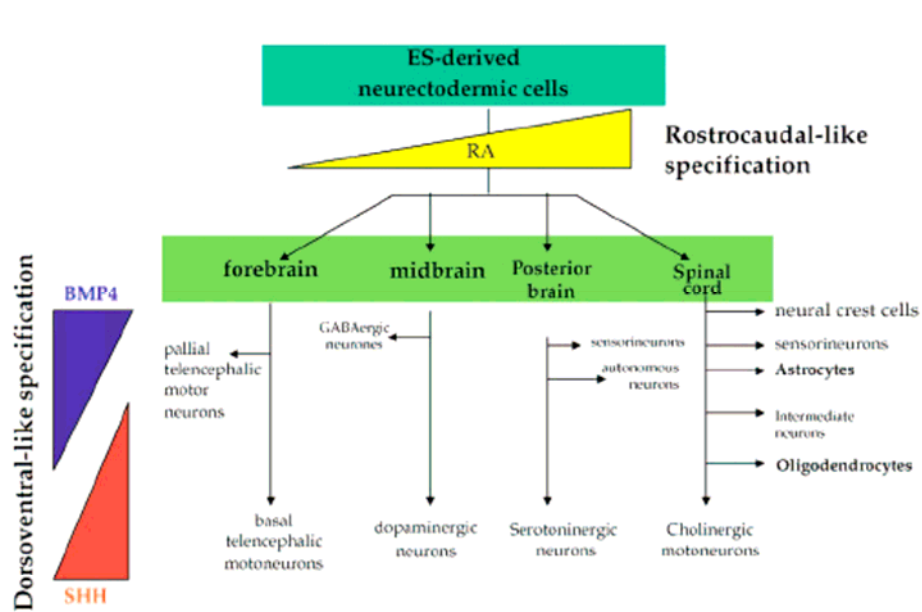


Figure 10 : Différenciation des cellules pro-neurales issues des cellules ES dans les différents types de cellules neurales. (Cazillis, 2006)

La différenciation des cellules ES en cellules neurales reproduit la différenciation spatio-temporelle obtenue au cours du développement embryonnaire *in vivo*. Parallèlement à l'identification rostro-caudale dépendante de l'acide rétinoïque des cellules souches neurales, le gradient de concentration des antagonistes BMP et SHH joue un rôle clé dans la spécification dorso-ventrale. Les effets opposés de SHH et BMP4 vis-à-vis des cellules pro-neurales génèrent des précurseurs exprimant des marqueurs spécifiques identiques à ceux observés pour les cellules progénitrices *in vivo*. Les différents types de cellules neurales générés *in vitro* à partir des cellules ES (murines ou humaines) sont localisées le long du gradient de concentration qui leur permet d'acquérir leur identité.

Ainsi, la culture des cellules ES en présence de signaux extracellulaires, identifiés comme morphogéniques chez l'embryon, activent des programmes de spécification et de régionalisation selon un programme spatio-temporel similaire à celui mis en place dans l'embryon (Cazillis, 2006). Dans ce contexte, l'utilisation des cellules souches ES différenciées ou non dans le traitement de modèles animaux des maladies neurodégénératives humaines apparaît comme une avancée encourageante. De nombreux travaux récents rapportent l'implantation fructueuse de cellules souches dans le cerveau de souris présentant des conditions pathologiques reproduisant certains troubles neurologiques observés chez l'homme (Lang, 2004).

Les précurseurs neuraux obtenus à partir de corps embryoides se différencient en neurones, astrocytes et oligodendrocytes une fois transplantés chez le rat, dans le cerveau en développement (Brustle, 1997). Lors de la transplantation chez le rat adulte portant des lésions de la moelle épinière de cellules dérivées de corps embryoides traités à l'acide rétinoïque, celles-ci se différencient non seulement dans les trois lignées neurales, mais migrent également loin du site de transplantation, permettant aux animaux de retrouver une certaine locomotion (McDonald, 1999). Ainsi, les cellules neuroépithéliales dérivées des cellules souches embryonnaires ont conservé leur potentiel de différenciation intact et la capacité de survivre et de régénérer les lésions du système nerveux central.

Enfin, la transplantation dans le cerveau murin de précurseurs neuraux humains, obtenus *in vitro*, génère des cellules différenciées qui colonisent le cerveau hôte sans provoquer de tumeurs (Zhang, 2001).

II.3/ Induction de tératocarcinomes à partir de cellules souches embryonnaires.

Les cellules ES ont des propriétés particulières qu'elles partagent avec les cellules cancéreuses : aucun agent immortalisant n'est nécessaire à leur dérivation, elles n'entrent pas en sénescence, prolifèrent sans limite apparente et ne sont pas sujettes à l'inhibition de contact (Burdon, 2002). Elles possèdent également un cycle cellulaire particulier, avec de très courtes phases G1 et G2, où les points de contrôle G1/S et G2/M n'existent pas (Savatier, 1994 ; Aladjem, 1998). Ceci permet un temps de doublement très court (environ 8h), incompatible avec une réparation des anomalies génomiques. Les cellules ES ne se « bloquent » donc pas à un stade particulier du cycle cellulaire et elles s'engagent dans un processus d'apoptose lors de dommages à l'ADN. Au cours de la différenciation, elles acquièrent les points de contrôle liés au cycle cellulaire et les processus apoptotiques p53-dépendants deviennent opérant (Aladjem, 1998).

Hors du contexte embryonnaire, les cellules ES génèrent des tératocarcinomes une fois injectées sous la peau de souris immunocompétentes (Robertson, 1987) (*figure 11*). Ces cellules étant capables de s'auto-renouveler et de générer tous les tissus de l'embryon, les tumeurs contiennent des cellules indifférenciées et des tissus différenciés comme la peau, l'os, le muscle strié ou le tissu nerveux, organisés de façon chaotique et représentant une ébauche de développement embryonnaire (Robertson, 1987 ; Burdon, 2002). Chez l'homme, les tératocarcinomes ont pour origine les cellules germinales et sont décrits comme des tumeurs différenciées solides et malignes. Chez la femme, les tumeurs restent bénignes et sont appelées tératomes.

La génération de tératocarcinomes sous-cutanés est une approche permettant de déterminer la capacité de différents mutants de cellules ES à proliférer et à se différencier *in vivo*, révélant ainsi l'implication de la protéine d'intérêt dans la balance survie – prolifération – différenciation – apoptose. Le modèle des tératocarcinomes est donc utilisé pour étudier le rôle d'une protéine dans la formation tissulaire et/ou le processus de tumorigenèse. L'induction de telles tumeurs a permis de démontrer l'implication spécifique des cadhérines dans la différenciation cellulaire et la formation des tissus *in vivo* (Larue, 1996) ainsi que l'implication de la protéine PARP (Nozaki, 1999), de l'intégrine $\alpha 5$ (Taverna, 2001) et de la vimentine (Langa, 2000) dans le processus cancéreux. L'inhibition de la croissance tumorale par la thrombospondine (TSP1) a pu également être étudiée ainsi (Lawler, 2001). Il s'agit donc d'une méthode de choix pour reconnaître une protéine oncogénique ou au contraire un élément suppresseur de tumeur.

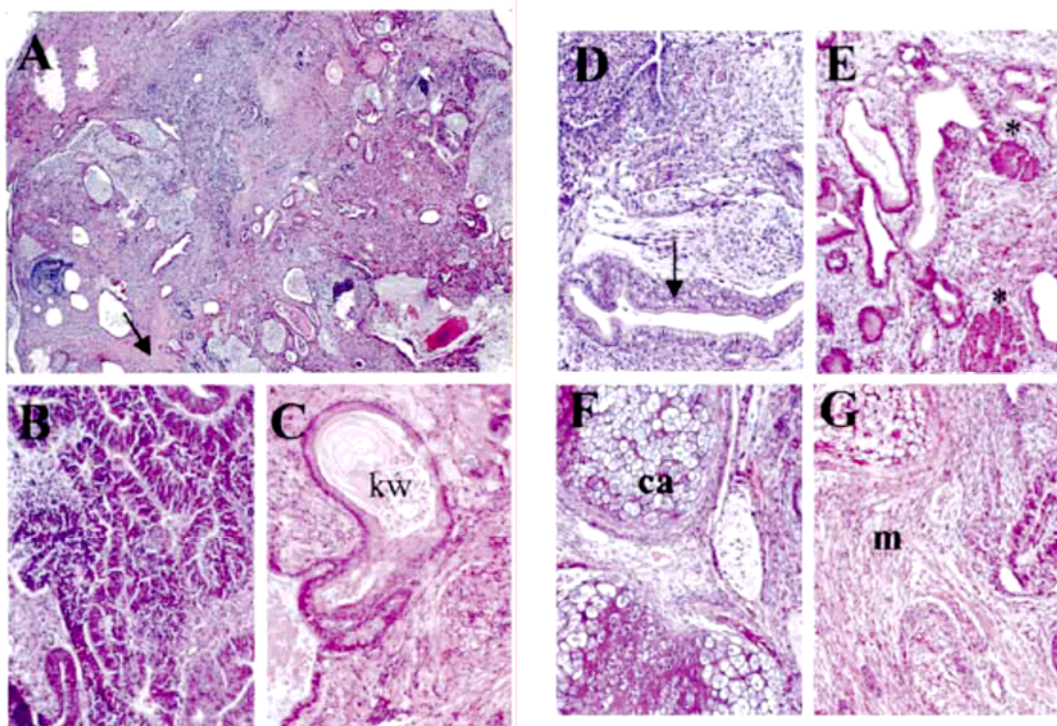


Figure 11 : Histologie des tératocarcinomes obtenus après injection sous-cutanée de cellules ES chez la souris. (Langa, 2000)

Une grande variété de tissus, dérivés des 3 feuillets embryonnaires, est observable à partir de coupes histologiques colorées à l'hématoxyline/éosine (A). Les tératocarcinomes contiennent du tissu neural (B), des spirales de kératine (C), de l'épithélium sécrétoire (D, flèche), du tissu glandulaire (E, astérix), de l'os et du cartilage (F) ainsi que des cellules musculaires (G).

Les clichés sont pris au grossissement X50 (A), X250 (D, E, G) ou X500 (B, C, F)

b : bone ; ca : cartilage ; kw : keratin whorl ; m : muscle.

III/ Les cellules souches neurales de mammifère.

Pour être considérée comme une cellule souche du système nerveux central, une cellule doit avoir le potentiel de générer des neurones (des différents types), des astrocytes et des oligodendrocytes, ainsi que de s'auto-renouveler afin de maintenir l'homéostasie du tissu neural. Le terme de progéniteur, bien que souvent utilisé pour désigner une cellule souche, fait référence à une cellule ayant un potentiel plus réduit : ceci concerne les cellules en amplification transitoire (progéniteurs primaires) ainsi que les cellules déjà engagées dans une voie de différenciation. Enfin, le terme de précurseur renvoie à une notion moins stricte qui décrit toute cellule étant moins engagée qu'une autre dans une voie de différenciation (McKay, 1997).

III.1/ Découverte et promesses des cellules souches neurales.

Le système nerveux central adulte a besoin de s'auto-renouveler pour son fonctionnement, notamment au cours de l'apprentissage et de la mémorisation (Kempermann, 1997). Il a longtemps été postulé que le cerveau adulte ne pouvait se régénérer, mais de nombreuses expériences novatrices ont démontré que des régions à potentiel de neurogenèse soutenue perduraient au cours de la vie des rongeurs (Altman, 1962 ; 1969 ; Altman & Das, 1965 ; Lois & Alvarez-Buylla, 1993, 1994 ; Kilpatrick & Bartlett 1993, 1995 ; Kuhn, 1997 ; Kempermann, 1997). Il en est de même chez l'Homme (Eriksson, 1998 ; Kukekov, 1999 ; Gage, 2000). Ces régions contiennent des précurseurs (cellules souches) capables de neurogenèse et de gliogenèse et incluent la zone sous ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux et la zone sous granulaire (SVG) du gyrus denté, dans l'hippocampe (Doetsch, 1999, 2003b ; Gage, 1999, 2000) (*figure 12a*). La neurogenèse se produit également à un niveau plus réduit dans d'autres régions du cerveau adulte, comme la moelle épinière (Weiss, 1996 ; McKay, 1997 ; Rao, 1999 ; Gage, 2000), le bulbe olfactif (Pagano, 2000), le cervelet (Laywell, 2000) ou la rétine (Tropepe, 2000) (*figure 12b*). Ces régions constituent de véritables niches pour les cellules souches neurales (Doetsch, 2003a ; Alvarez-Buylla & Lim, 2004), et fournissent une population cellulaire hétérogène multipotente capable de donner des neurones et de la glie (astrocytes, oligodendrocytes) (Gage, 1995 ; McKay, 1997 ; Pagano, 2000). Les cellules souches adultes sont quiescentes et expriment les marqueurs GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) et nestine (Gage, 1998 ; Doetsch, 1999 ; Garcia, 2004 ; Merckle, 2004). Le profil génétique de ces cellules souches varie en fonction de l'âge de l'individu (Gage, 2000 ; Abramova, 2005).

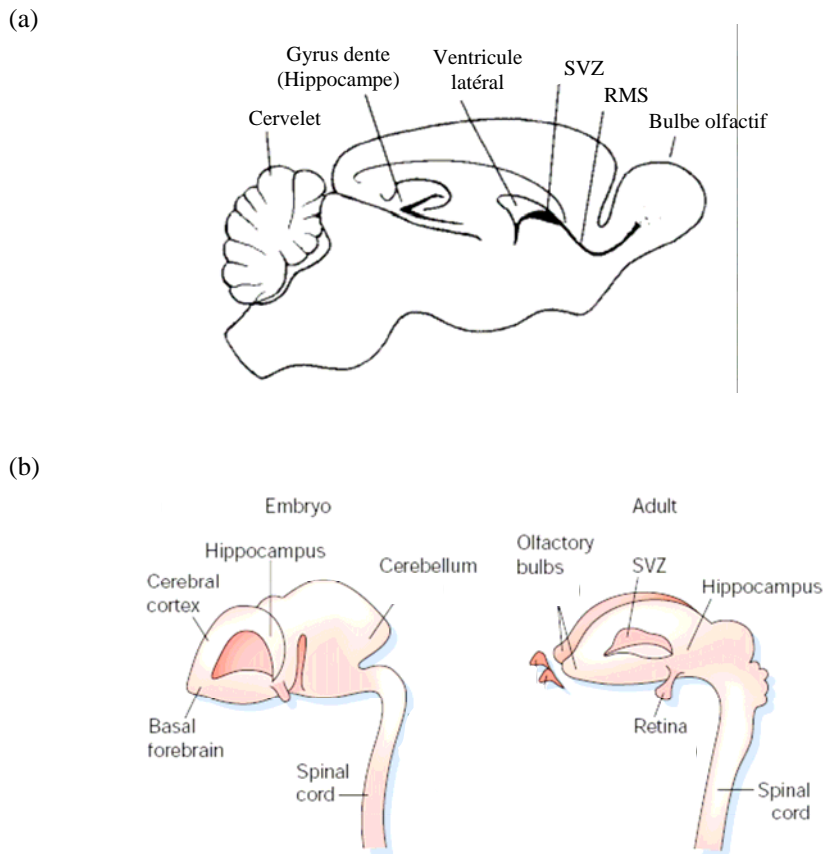


Figure 12 : Localisation des cellules souches neurales.

Bien que la neurogenèse persiste dans le cerveau adulte, la naissance de nouvelles cellules neurales est réduite à un pool de cellules qui sont enrichies dans seulement quelques régions du cerveau (voir texte). Les deux zones principales sont la zone sous-ventriculaire (SVZ, *subventricular zone*) des ventricules latéraux et la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe. Les précurseurs neuronaux, ou neuroblastes, issus de la zone sous-ventriculaire migrent le long de la RMS (*rostral migratory stream*) jusqu'aux bulbes olfactifs et se différencient en inter-neurones.

(a) Coupe sagittale du cerveau adulte murin (Uchida, 2000).

(b) Principales régions du système nerveux central embryonnaire et adulte à partir desquelles des cellules souches neurales ont pu être isolées (Temple, 2001).

Des cellules souches neurales pourraient résider également dans des régions non neurogéniques du cerveau adulte (Palmer, 1999).

Les cellules souches isolées à partir du cerveau fœtal ou adulte de rongeur conservent *in vitro* la capacité de s'auto-renouveler et de proliférer en présence de facteurs mitogéniques tels que le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) et l'EGF (*epidermal growth factor*) (Reynolds & Weiss, 1992 ; Richards, 1992 ; Temple & Davis, 1994 ; Davis & Temple, 1994 ; Gritti, 1996 ; Temple & Alvarez-Buylla, 1999). Ces cellules, qui correspondent aux progéniteurs neuraux multipotents, sont cultivées en monocouche en conditions adhésives ou en agrégats flottants, appelés neurosphères (Reynolds & Weiss, 1992 ; Davis & Temple, 1994 ; Temple & Davis, 1994 ; Gritti, 1996 ; Temple & Alvarez-Buylla, 1999). Elles sont multipotentes, puisque capables d'engendrer des neurones, des astrocytes, et des oligodendrocytes (Morshead, 1994 ; Gritti, 1996 ; Reynolds & Weiss, 1996 ; Palmer, 1997). L'auto-renouvellement est évalué par leur capacité à reformer des neurosphères après chaque dissociation.

Les cellules du cerveau fœtal humain peuvent également répondre aux facteurs de croissance et former des neurosphères en culture (Carpenter, 1999). L'injection de neurosphères humaines dans la zone sous ventriculaire ou le gyrus dente de rats adultes immunodéprimés conduit à une prolifération, une capacité de migration et de différenciation des cellules humaines similaires à celles des cellules de l'hôte (Brustle, 1998 ; Fricker, 1999). L'existence de cellules souches capables d'initier ces neurosphères est démontrée par l'expansion clonale de ces dernières (Uchida, 2000). La transplantation de cellules souches neurales humaines CD133C⁺ dans les ventricules latéraux de souriceaux nouveau-nés immunodéficients leur permet de s'intégrer à l'ensemble du cerveau murin, de s'y différencier en cellules des 3 lignées neurales et d'y perdurer tout au long de la vie de l'hôte. Enfin, l'examen histologique des cerveaux chimériques ne met en évidence ni mauvais développement ni foyer néoplasique (Uchida, 2000).

Le système nerveux central est capable de répondre à un dommage en entreprenant une régénération cellulaire, mais le remplacement inadéquat ou avorté de cellules montre une capacité de régénération bien limitée par rapport à la réparation fonctionnelle d'autres organes comme la peau, le foie ou le pancréas (Rice & Scolding, 2004). Le système hématopoïétique, en particulier, maintient en permanence des populations cellulaires circulantes de courtes durées de vie. Néanmoins, la découverte de la capacité de réparation de cellules souches neurales adultes en cas de lésion (Parent, 2003) ou dans le cas de maladies telles que la sclérose en plaques (Scolding, 1998), a permis d'élaborer de nouvelles théories pour expliquer les maladies neurodégénératives (Armstrong & Barker, 2001). La compréhension des processus biologiques en jeu lors de la régénération tissulaire telle que la remyélinisation, et les raisons pour lesquelles ces processus sont peu présents - voire inexistantes - dans les cas

pathologiques, est essentiel au développement de traitements efficaces (Scolding, 1998 ; Halfpenny, 2002).

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par une perte continue de neurones spécifiques qui ne sont pas remplacés. La démence caractéristique de la maladie d'Alzheimer est attribuée à la dégénérescence des neurones corticaux cérébraux ; dans la maladie de Parkinson, le désordre des mouvements résulte de la perte des neurones dopaminergiques de la *substantia nigra* ; la perte de neurones dans le striatum conduit à des caractères anormaux moteurs, cognitifs et affectifs caractéristiques de la maladie de Huntington. L'incapacité des cellules souches neurales endogènes à répondre convenablement à la perte cellulaire lors des maladies neurodégénératives pourrait contribuer à la progression de ces désordres (Armstrong & Barker, 2001). Les cellules souches neurales pourraient être une cible du processus pathologique et seraient incapables de répondre aux signaux potentiels produits par les neurones en dégénération. Cette incapacité peut être due à un défaut dans la transduction des signaux émis par les neurones pathologiques, une capacité de prolifération des cellules souches neurales affaiblie, ou un défaut dans la migration et/ou la différenciation de ces cellules. Deuxième possibilité, le taux de perte cellulaire dû à la neurodégénération pourrait être plus élevé que le taux de division des cellules souches neurales et donc plus élevé que le taux de remplacement cellulaire. Troisième hypothèse, les neurones qui dégénèrent en réponse aux processus de la maladie pourraient ne pas produire de signaux appropriés pour stimuler les cellules souches neurales. Enfin, des signaux inhibiteurs pourraient être produits, signaux qui empêcheraient les cellules souches neurales de répondre efficacement (Armstrong & Barker, 2001).

Malgré une capacité de régénération bien limitée (Rice & Scolding, 2004), de nouveaux espoirs de thérapie par stimulation des précurseurs endogènes sont apparus (Halfpenny, 2002 ; Lie, 2004 ; Rice, 2003 ; Rice & Scolding, 2004).

Les effets salutaires de l'administration de facteurs de croissance ont pu être démontré dans un modèle rongeur pour la maladie de Parkinson (Fallon, 2000). Après la mort chimio-induite des neurones dopaminergiques de la *substantia nigra*, l'injection dans le striatum de TGF α , un ligand mitogène du récepteur à l'EGF pour les cellules souches et progénitrices de la SVZ, permet une amélioration du comportement des animaux. Cette amélioration est attribuée à la présence de nouveaux neurones d'un phénotype dopaminergique dans le striatum. La génération de ces neurones dans le striatum est très surprenante étant donné que la mort neuronale s'est produite dans une région différente du système nerveux central (*substantia nigra*) et qu'en conditions physiologiques, aucun neurone dopaminergique n'est observé dans le striatum adulte (Kuhn, 1997).

L'injection combinée de FGF-2 et EGF dans le ventricule latéral de rats adultes après une dégénérescence sélective des neurones pyramidaux de l'hippocampe permet d'augmenter la prolifération des cellules souches neurales endogènes de la SVZ. Ces cellules permettent la régénération d'environ 40% des neurones éliminés. Les nouveaux neurones pyramidaux ont survécu au moins six mois après la dégénération induite et le comportement des animaux traités s'est amélioré (Nakatomi, 2002).

Chaque maladie neurodégénératrice pose des problèmes spécifiques et exigera des stratégies spécifiques pour mobiliser les cellules souches endogènes. Les stratégies de traitement devront être basées sur la connaissance des mécanismes de neurogenèse adulte et ceux spécifiques d'une maladie donnée (Lie, 2004). Etant donné la diversité de types cellulaires neuraux, la complexité des réseaux et la capacité régénératrice spontanée limitée, la réparation du système nerveux central adulte des mammifères est un défi unique. Il existe de nombreuses physiopathologies, qui affectent des régions diverses du système nerveux central humain, et la stratégie de traitement utilisant les cellules souches ou progénitrices endogènes ne conviendra pas à toutes les maladies (Lie, 2004).

La difficulté de traitement des maladies touchant le système nerveux central provient de l'existence de la barrière hémato-encéphalique qui empêche toute délivrance de molécules thérapeutiques. La transplantation de cellules souches neurales, qu'elles soient issues directement du système nerveux central ou issues de cellules ES, est donc une thérapie de choix. Les cellules transplantées agissent via de multiples mécanismes. La maladie de Sandhoff est une maladie monogénique progressive souvent létale au stade infantile, qui résulte de l'accumulation anormale de gangliosides dans les lysosomes. Dans le modèle murin de la maladie, la transplantation de cellules souches neurales murines ou humaines permet de prolonger la vie des animaux de 70% et améliore la fonction moteur et la coordination des mouvements de l'animal (Lee, 2007). Les cellules transplantées colonisent l'ensemble du cerveau mais le faible degré de différenciation en neurones corticaux ne suffit pas à expliquer l'action bénéfique de la greffe. L'impact de la thérapie provient probablement des cellules gliales dérivées qui joueraient un rôle de cellules chaperonnes : elles expriment l'enzyme déficiente chez les souris mutantes et ceci contrebalance la déficience métabolique des cellules hôtes (Lee, 2007). De plus, les cellules souches neurales transplantées ont une action anti-inflammatoire dans les cas de traumatismes cérébraux (Park, 2002) ou de la moelle épinière (Teng, 2002). C'est également le cas dans l'étude menée chez le modèle de la maladie de Sandhoff (Lee, 2007). Préserver les cellules endogènes paraît donc tout aussi important, et probablement plus fiable, que de reconstruire de nouveaux réseaux de connexion. Néanmoins,

la difficulté de la thérapie cellulaire apparaît quand on sait que dans certains cas, et notamment celui de la maladie de Sandhoff, la moelle épinière et le système nerveux périphériques sont également atteints. Les transplantations intracrâniennes sont donc parfois insuffisantes.

La grande capacité migratrice des progéniteurs primaires dérivant des cellules souches neurales, leur facilité d'expansion *in vitro* et le fait que les cellules transplantées aient un comportement similaire à celui des cellules souches endogènes (Snyder, 1992, 1997 ; Fricker, 1999 ; Uchada, 2000) en font d'excellents candidats à la thérapie cellulaire (Lindvall, 2004 ; Uchida, 2005 ; Muller, 2006). La possibilité d'isoler, de manipuler *ex-vivo* puis de réimplanter les cellules souches neurales d'un patient offre également de vrais espoirs de thérapies géniques (Flax, 1998 ; Martinez-Serrano, 2001). Enfin, les cellules souches neurales exogènes, manipulées *ex-vivo*, pourraient, une fois greffées, disséminer des agents thérapeutiques tels que des facteurs de croissance, des cytokines, des molécules anti-cancéreuses (Muller, 2006 ; Yip, 2006).

III.2/ Les cellules souches neurales embryonnaires et adultes *in vivo*.

Les cellules neuroépithéliales, exprimant le filament intermédiaire Nestine, forment le tube neural à l'origine du système ventriculaire et du canal spinal adulte. Ce sont les cellules souches neurales primitives desquelles dérivent toutes les populations progénitrices du système nerveux central. Le neuroépithélium est une monocouche pseudo-stratifiée (tube neural) dont les cellules, allongées, se situent à la surface apicale (ventriculaire) de la lame basale (Götz, 2005b). Ces cellules possèdent une polarité apicale/basale classique de cellules épithéliales et se divisent à la surface ventriculaire. La division symétrique de ces cellules souches permet l'augmentation de leur nombre ; elle est suivie de la génération par division asymétrique d'une cellule souche résidante dans la zone ventriculaire et d'une cellule progénitrice qui va migrer, éventuellement proliférer, avant de quitter le cycle cellulaire pour s'engager dans une voie de différenciation neuronale (Wodarz, 2003 ; Haubensak, 2004) (*figure 13a*). La neurogenèse a lieu à E10,5 chez la souris. Au cours de celle-ci, le neuroépithélium se stratifie. Les cellules neuroépithéliales donnent alors naissance aux cellules de la glie radiaire qui se distinguent des cellules neuroépithéliales par l'expression de marqueurs gliaux tels que Glast, Blast ou RC2, épitope correspondant à une modification post-traductionnelle de la nestine (Kriegstein, 2003 ; Tramontin, 2003 ; Anthony, 2004 ; Götz & Barde, 2005 ; Götz & Huttner, 2005). Les corps cellulaires (noyaux) des cellules radiaires en division se localisent dans la zone apicale, dénommée zone ventriculaire. Les progéniteurs basaux qui en dérivent définissent la zone

sous-ventriculaire. Les neurones issus de la division asymétriques des cellules progénitrices migrent vers les couches les plus basales du neuroépithélium en développement. Les cellules de la glie radiaire s'étendent de la surface apicale de la zone ventriculaire jusqu'aux couches neuronales de la lame basale (*figure 13b*). Elles conservent une polarité apicale/basale et entrent en mitose à la surface apicale de la zone ventriculaire, ou très proche de la lumière du ventricule (Kriegstein, 2003). Elles sont reconnues comme étant la population majeure de progéniteurs neuronaux dans le cerveau embryonnaire des mammifères (Anthony, 2004 ; Götz & Barde, 2005). Lors de la neurogenèse corticale, qui débute à E10 chez la souris, la glie radiaire permet aux neurones néo-synthétisés de migrer le long de son extension pour qu'ils colonisent les différentes couches corticales (Götz, 2002 ; 2003).

La zone ventriculaire (VZ) est un donc épithélium pseudo-stratifié qui contient les cellules souches neurales multipotentes. Lors du développement périnatal, l'anatomie de cette région germinale se modifie profondément. Les cellules de la glie radiaire, caractérisées par le marqueur RC2, un épitope de la nestine, sont nombreuses à la naissance. Alors que ces cellules persistent à l'âge adulte chez les oiseaux, les reptiles et les poissons, elles vont disparaître chez les mammifères (Merckle & Alvarez-Buylla, 2006). Le développement post-natal de la zone ventriculaire va mener à leur disparition progressive en quinze jours environ, disparition qui coïncide avec l'apparition dans la région sous-ventriculaire d'astrocytes germinatifs, caractérisés par l'expression du marqueur GFAP (Tramontin, 2003). Ces astrocytes (cellules de type B) sont issus des cellules de la glie radiaire de la zone ventriculaire : ils représentent la source principale de cellules souches neurales adultes (Doetsch, 1999 ; Tramontin, 2003 ; Merckle, 2004 ; Garcia, 2004 ; Merckle & Alvarez-Buylla, 2006) (*figure 13c et 13d*). Chez l'adulte, la SVZ (également appelée zone sous-épendymaire), est physiquement séparée de la lumière du ventricule latéral par une monocouche de cellules épendymaires ciliées qui servent notamment à la circulation du liquide céphalo-rachidien.

Ces astrocytes germinatifs, capables de générer aussi bien les neurones que les cellules de la glie, sont principalement situés dans deux régions : la zone sous-ventriculaire (ou sous-épendymaire) du mur du ventricule latéral et la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe. Les cellules souches du cerveau adulte sont donc des astrocytes germinatifs, non seulement de part leur expression de la protéine GFAP (Doetsch, 1997 ; 1999), mais également par leur morphologie et les ultra-structures telles que les granules de glycogène, les agrégats de

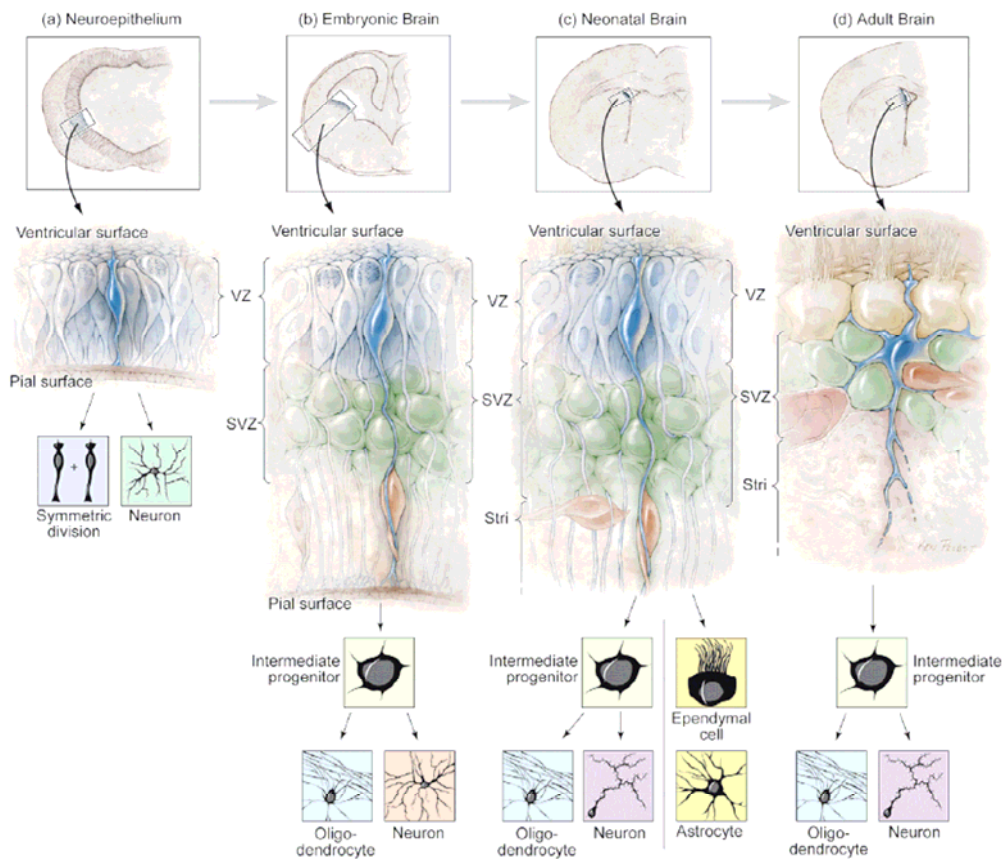


Figure 13 : Cellules souches neurales et lignages cellulaires au niveau des ventricules latéraux du cerveau de mammifère. (Merkle & Alvarez-Buylla, 2006)

(a) Aux stades précoces du développement, les cellules neuroépithéliales qui composent le tube neural possèdent un mode de division symétrique qui leur permet d'accroître le nombre de cellules souches neurales (en bleu). Certains types de neurones sont également produits après division asymétrique.

(b) Dans le cerveau embryonnaire, les cellules de la glie radiaire de la zone ventriculaire génèrent après division asymétrique soit un neuroblaste (en rouge), soit un progéniteur (en vert). Les neuroblastes migrent le long des extensions cytoplasmiques des cellules de la glie radiaire. Les progéniteurs sont à l'origine des neurones du striatum et des oligodendrocytes.

(c) Les cellules de la glie radiaire subissent une modification au cours de la période néonatale. En réorganisant leur cytosquelette, une partie d'entre elles donne naissance à des cellules ciliées, les cellules épendymaires. Une autre partie génère les astrocytes germinatifs de l'adulte (cellules souches neurales adultes). Enfin, elles peuvent également engendrer progéniteurs intermédiaires à l'origine des oligodendrocytes et des inter-neurones du bulbe olfactif.

(d) Dans le cerveau adulte, les astrocytes germinatifs conservent souvent un phénotype radiaire. Ils sont en contact avec le ventricule et la lame basale des vaisseaux sanguins et génèrent des oligodendrocytes et les inter-neurones du bulbe olfactif.

VZ : *ventricular zone* ; SVZ : *subventricular zone* ; Stri : *striatum*.

filaments intermédiaires et les jonctions de type *gap* (Doetsch, 2003b). Ces caractéristiques astrocytaires entraînent une confusion avec les astrocytes différenciés non germinatifs. L'élimination conditionnelle des cellules exprimant la GFAP mène à une perte quasi complète de neurogenèse (Garcia, 2004).

Chez l'adulte, la SVZ (ou région sous-épendymaire) est une région germinale spécialisée qui s'étend le long du ventricule latéral et qui produit de nouveaux précurseurs de neurones. Ces neuroblastes (cellules de type A), migrent sur de longues distances (3 à 8 mm chez la souris) le long d'une voie de migration dite « rostrale » communément appelée RMS (*Rostral Migratory Stream*) jusqu'au bulbe olfactif où ils se différencieront en interneurons glomérulaires et périglomérulaires du bulbe olfactif (Doetsch & Alvarez-Buylla, 1996 ; Doetsch, 1997 ; 2003a). Les cellules souches neurales (cellules de type B), quasiment quiescentes, persistent dans la zone sous-ventriculaire par division asymétrique (Anderson, 2001). Ceci leur permet de s'auto-renouveler, tandis que les progéniteurs primaires (cellules de type C) se divisent symétriquement afin d'accroître leur nombre (Haubensak, 2004 ; Noctor, 2004). Les cellules souches adultes astrocytaires (cellules de type B) donnent naissance aux progéniteurs en prolifération (cellules de type C), qui produisent à leur tour les neuroblastes (cellules de type A) (Doetsch, 1999) (*figure 14a*). Les cellules de type C forment une population hétérogène dont une sous-population exprime le facteur de transcription Mash1, un marqueur des précurseurs de neurones et d'oligodendrocytes (Parras, 2004 ; 2007). Certaines cellules C expriment également Olig2, un autre facteur de transcription bHLH (*basic Helix Loop Helix*), requis pour la production des oligodendrocytes et des moto-neurones, et génèrent non pas des neuroblastes, mais des oligodendrocytes (Marshall, 2005 ; Menn, 2006), et probablement des astrocytes (Marshall, 2005).

La couche sous-granulaire de l'hippocampe (SGZ) est la seconde région où l'on observe la production de nouveaux neurones chez l'adulte. L'hippocampe est une structure bilatérale et symétrique, faisant partie du système limbique qui gère les émotions, les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation. La SGZ est une fine couche germinale située entre le hile de l'hippocampe et la couche granulaire. Dans le gyrus dente, de nouveaux neurones sont générés à partir de la SGZ, migrent sur de courtes distances et se différencient en neurones granulaires. La neurogenèse dans l'hippocampe a été corrélée à des mécanismes d'apprentissage et de mémorisation (Gould, 1999a ; 1999b ; Kempermann, 1997 ; 1998 ; Kempermann & Gage, 1999).

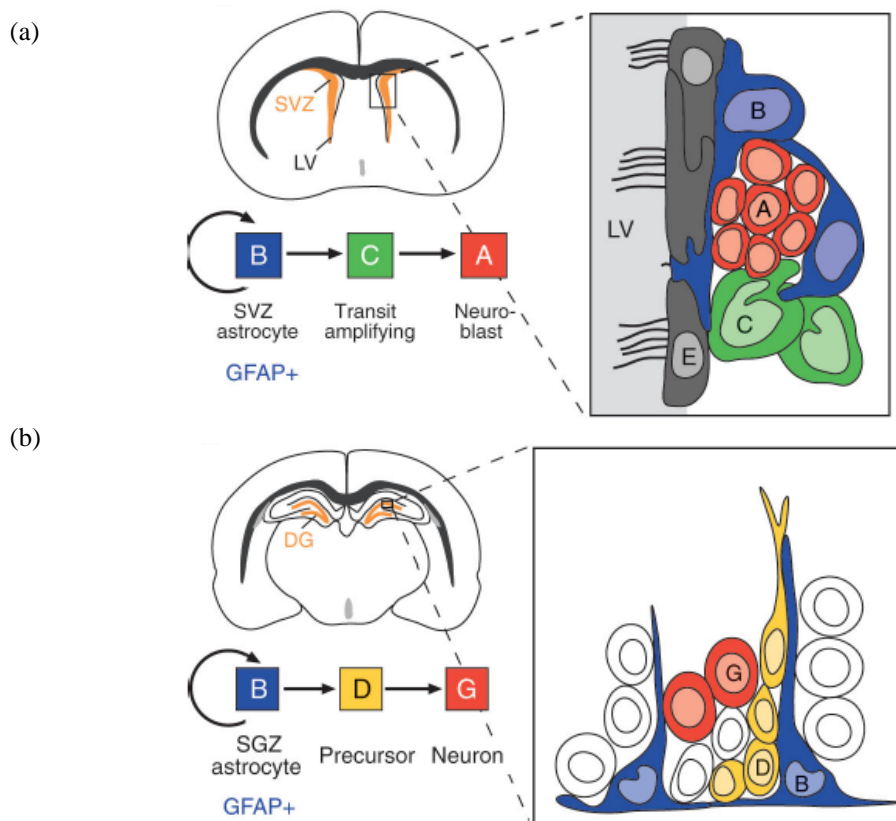


Figure 14 : Organisation et types cellulaires des deux régions majeures de neurogenèse du cerveau adulte murin. (Doetsch, 2003b)

(a) Schéma d'une coupe coronale montrant la zone sous-ventriculaire (SVZ, en orange) adjacente au ventriculaire latéral (LV), bordé par les cellules épendymaires ciliées (E, en gris). Dans la région sous-ventriculaire, les astrocytes germinatifs GFAP⁺ (cellules B, en bleu), sont les cellules souches neurales adultes, capables d'auto-renouvellement et majoritairement quiescentes. Le long du mur ventriculaire, la SVZ contient des précurseurs neuronaux ou neuroblastes (cellules A, en rouge) qui forment un réseau de voies de migration qui se regroupent au niveau antérieur dorsal de la SVZ pour la quitter et former une seule et même voie, la RMS. Cette voie de migration achemine rostralement les cellules A vers le bulbe olfactif où elles se différencieront en interneurones. Dans la SVZ comme dans la RMS, ces neuroblastes sont engainés par des prolongements de cellules de type B qui forment des tubes à l'intérieur desquels les neuroblastes se déplacent. Les progéniteurs neuraux (cellules C, en vert) forment de petits groupes de cellules hautement proliférantes, dispersés le long de la SVZ et de la RMS.

(b) Schéma d'une coupe coronale montrant la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus dente (DG, en orange) de l'hippocampe. Les astrocytes GFAP⁺ (cellule de type B, en bleu) sont les cellules souches donnant naissance aux précurseurs intermédiaires (cellules D, en jaune) qui génèrent les neurones granulaires (G, en rouge).

Contrairement aux progéniteurs intermédiaires de la SVZ (cellules de type C) qui sont de grande taille et hautement mitotiques (Doetsch, 1997), les précurseurs de la SGZ de l'hippocampe (cellules de type D, *figure 14b*) sont petites et ne se divisent pas fréquemment (Seri, 2001). Ceci suggère que l'amplification des précurseurs transitoires du gyrus dente, et donc la production de nouveaux neurones, est probablement limitée.

MELK (*Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase*) est un marqueur des progéniteurs neuraux multipotent capables d'auto-renouvellement dans le cerveau en développement (Nakano, 2005). Au niveau du gyrus dente adulte de l'hippocampe, l'expression de MELK n'est pas détectable. MELK n'est donc pas présente dans toutes les cellules souches neurales, ni exigée pour le maintien de l'état multipotent. L'absence d'expression dans l'hippocampe adulte suggère cependant qu'il existe des différences entre cellules souches et/ou progénitrices de l'hippocampe et celle de la SVZ. Le gène MELK est fortement exprimé dans les progéniteurs en prolifération *in vivo* et contrôle la prolifération des progéniteurs neuraux multipotents *in vitro* (Nakano, 2005). Ces progéniteurs hautement prolifératifs ne sont pas trouvés dans l'hippocampe adulte (Seri, 2001). Récemment des différences dans la capacité à former des neurosphères entre les cellules dérivées du gyrus dente et celles dérivées des ventricules latéraux ont été démontrées (Seaberg & van der Kooy, 2002). Selon cette étude, des cellules souches peuvent être isolées à partir des régions sub-épendymaires adjacentes de l'hippocampe, mais le gyrus dente adulte en lui-même ne contient pas de cellules souches neurales résidentes. En effet, bien que le ventricule latéral ainsi que d'autres régions sub-épendymaires directement adjacentes à l'hippocampe contiennent des cellules souches neurales, seuls des progéniteurs neuronaux et gliaux distincts, aux capacités d'auto-renouvellement limitées, seraient présents dans le gyrus dente adulte. Ce qui suggère que ce sont des progéniteurs neuronaux, et non pas des cellules multipotentes, qui seraient la source des neurones du gyrus dente générés au cours de la vie adulte (Seaberg & van der Kooy, 2002).

Les cellules souches neurales (Gritti, 1996 ; Temple & Alvarez-Buylla, 1999) et certains progéniteurs plus restreints (Tropepe, 2000 ; Seaberg & van der Kooy, 2002) sont capables de former des neurosphères clonales *in vitro*. Ces neurosphères sont essentielles à l'étude des aspects fondamentaux de la biologie de ces cellules : prolifération, multipotence, auto-renouvellement, longévité. La prolifération est définie comme la capacité de produire une neurosphère clonale en réponse à EGF et FGF2 (Reynolds & Weiss, 1992) ; la multipotence comme la capacité d'une cellule à produire les trois lignées cellulaires neurales principales (neurones, astrocytes et oligodendrocytes) (Gage, 1995 ; Gritti, 1996 ; Reynolds & Weiss,

1996 ; McKay, 1997 ; Palmer, 1997) ; l'auto-renouvellement comme la capacité de cellules issues de neurosphères dissociées à produire des colonies secondaires (Gritti, 1996 ; Reynolds & Weiss, 1996 ; McKay, 1997); la longévité comme le maintien *in vitro* des trois premières caractéristiques sur une longue période, mais aussi le maintien de la cellule *in vivo* durant toute la vie de l'organisme (Seaberg, 2005). Le terme de cellule souche fait référence à une cellule possédant ces quatre propriétés, celui de progéniteur à une cellule qui possède au moins une de ces propriétés, et le terme de précurseur se reporte plus généralement à une population mixte (Seaberg, 2005). La distinction entre cellules souches et progénitrices n'est donc pas insignifiante. Des différences fondamentales existent certainement entre une cellule qui persiste tout au long de la vie d'un organisme (et pendant de longues périodes de culture) en conservant ses capacités de proliférer, de s'auto-renouveler et de produire les trois lignées neurales majeures et une cellule qui ne possède ces propriétés *in vitro* ou *in vivo* seulement pendant un temps donné (Seaberg, 2005).

III.3/ Spécification des cellules souches neurales.

Le système nerveux central se développe à partir d'un petit nombre de cellules très plastiques, qui prolifèrent, acquièrent une identité régionale et produisent les différents types cellulaires (cellules gliales et neurones), tout en conservant la capacité de s'auto-renouveler *in vitro* (Merckle & Alvarez-Buylla, 2006). La génération des différents types neuraux pendant le développement du système nerveux des vertébrés implique des divisions symétriques et asymétriques des différentes cellules souches (les cellules neuroépithéliales puis les cellules de la glie radiale) (Wodarz, 2003 ; Haubensak, 2004 ; Noctor, 2004) (**figure 15**). *In vivo*, ces cellules souches neurales sont spécifiées dans le temps et l'espace (Merckle & Alvarez-Buylla, 2006). Au cours du développement, elles changent de morphologie et génèrent des cellules-filles différentes. Leur profil d'expression génétique est également différent selon l'étape du développement. Certains gènes sont communs aux cellules souches précoces et tardives, d'autres ne sont exprimés qu'à certaines étapes du développement.

L'expression de gènes spécifiques d'une étape (expression temporelle) peut coordonner un programme de développement intrinsèque. Dans le cortex cérébral en développement, non seulement la neurogenèse a lieu avant la gliogenèse, mais les différents types de neurones apparaissent selon un ordre particulier, correspondant aux différentes couches corticales. Ainsi, les neurones de Cajal-Retzius sont parmi les premiers générés, puis les neurones des couches profondes et finalement les neurones de la couche corticale superficielle. Les cellules souches

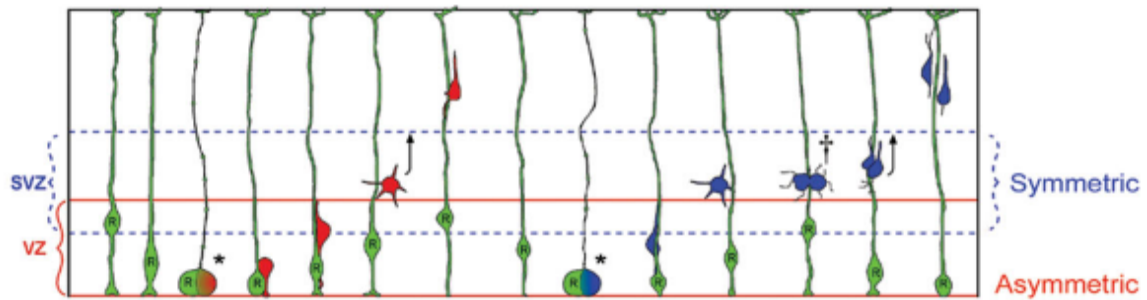


Figure 15 : Divisions symétriques et asymétriques des cellules souches neurales et des progéniteurs. (Noctor, 2004)

Les cellules de la glie radiaire (R) se divisent asymétriquement dans la zone ventriculaire (VZ) afin de s'auto-renouveler tout générant un neurone post-mitotique (rouge) ou un progéniteur intermédiaire (bleu). Celui-ci se divise de façon symétrique dans la zone sous-ventriculaire (SVZ). Les cellules-filles différenciées migrent le long du prolongement cytoplasmique de la cellule souche avant de coloniser les différentes couches corticales.

et/ou progénitrices multipotentes corticales isolées et cultivées *in vitro* se différencient selon la même chronologie que celle observé *in vivo*, à savoir neurogenèse puis gliogenèse (Qian, 2000) et subissent des divisions asymétriques répétées, générant séquentiellement les différents types neuronaux dans un ordre identique de celui *in vivo* (Shen, 2006). Les progéniteurs en culture sont donc capables de générer une descendance spécifique à un temps donné, de façon similaire à celle des progéniteurs *in vivo*. Ce programme paraît être irréversible : après plusieurs jours de culture, les progéniteurs corticaux sont incapables de produire les types cellulaires précoces, même lorsqu'ils sont co-cultivés avec des précurseurs plus précoces (Shen, 2006).

Ceci est en accord avec de précédentes études de transplantation chez la souris. Les progéniteurs corticaux précoces peuvent produire des neurones tardifs après transplantation dans la zone germinale tardive, ce qui indique qu'ils sont plastiques et peuvent répondre convenablement à des facteurs environnementaux tardifs (McConnell & Kaznowski, 1991). Cependant, les cellules progénitrices corticales tardives sont incapables de répondre aux facteurs précoces et sont restreintes à des destinées tardives (Frantz & McConnell, 1996 ; Desai & McConnell, 2000).

Ainsi, chez la souris, le mécanisme temporel de développement est programmé dans les cellules progénitrices corticales. Au fur et à mesure que chaque couche corticale est générée, les cellules souches neurales comme les neuroblastes sont restreints dans la production de types neuronaux, et leur culture sous forme de neurosphères, y compris en présence de progéniteurs issus de stades embryonnaires plus précoces, ne restaurent pas leur plasticité (Shen, 2006).

Ces données indiquent que le destin des cellules progénitrices neurales n'est pas aisément modifié par les facteurs de l'environnement et suggère que des facteurs cellulaires intrinsèques sont critiques pour la chronologie des événements. L'inactivation du gène *Foxg1*, codant pour un facteur essentiel au développement cérébral, stimule la production de neurones de Cajal-Retzius à partir des progéniteurs et abolit la génération des plaques corticales tardives (Hanashima, 2004). L'utilisation de shARN réduisant l'expression de *Foxg1* réinitialise la destinée des progéniteurs à mi-gestation (E12,5) mais pas celle des progéniteurs plus tardifs (E15), qui restent incapables de générer des neurones des couches corticales précoces (Shen, 2006). Ceci révèle que la re-spécification de l'identité des précurseurs corticaux par *Foxg1* a lieu à E13. De plus, alors que la neurogenèse est réinitialisée dans les progéniteurs précoces traités avec les shARN-*Foxg1*, la gliogenèse est affaiblie. Les cellules souches neurales voient

donc leur potentialité de neurogenèse modifiée pendant le développement, et lorsque les restrictions peuvent être annihilées, une fenêtre de plasticité demeure (Shen, 2006).

Cependant, nous sommes en droit de nous demander si les cellules souches neurales *in vitro*, isolées de l'environnement du tissu, représentent une réalité *in vivo* (Gage, 2000 ; Gabay, 2003). Des neurosphères tripotentes peuvent être obtenues à partir de progéniteurs qui, *in vivo*, ne produisent pas les trois types cellulaires (Gabay, 2003). Ces progéniteurs acquièrent une potentialité accrue de différenciation en réponse aux conditions de cultures, notamment par le biais du mitogène FGF-2. Ainsi, il est possible que les propriétés des cellules souches neurales soient créées par les conditions de culture mais sans réalité *in vivo*.

L'antigène de surface Lewis X (LeX, aussi connu sous les appellations SSEA-1 et CD15) est exprimé par les progéniteurs neuraux, capables de générer des neurosphères *in vitro* (Capela & Temple, 2002). Dans les cultures cellulaires issues de cerveaux embryonnaires au stade E12, approximativement 65% des cellules sont LeX⁺ et la présence d'ARNm MELK est restreinte à la fraction cellulaire LeX⁺ (Nakano, 2005). Dans les conditions de culture où chaque neurosphère est issue d'une cellule (2,000 cells/ml, Tropepe, 1999), les progéniteurs MELK⁺ au stade E15 ont une capacité à produire des neurosphères 5 fois supérieure à celle des progéniteurs Lex⁺. Ceci suggère que la fraction MELK⁺ des cellules Lex⁺ est enrichie en cellules capables d'initier des neurosphères *in vitro* (Nakano, 2005). Il existe donc une hétérogénéité cellulaire des neurosphères.

Chez la souris adulte, les cellules souches neurales (cellules B) sont quiescentes (Doetsch, 1999). Chez l'homme, y compris dans les tumeurs cérébrales, les cellules souches (CD133⁺) sont également quiescentes (Ligon, 2007). En culture, les neurosphères multipotentes répondent aux facteurs de croissance et prolifèrent. Les cellules isolées *in vitro* correspondent donc plus à la définition des progéniteurs en amplification transitoire (cellules de type C) (McKay, 1997 ; Doetsch, 1999). Ainsi, l'EGF convertit les précurseurs neurogéniques en amplification transitoire (cellules C), isolés à partir du cerveau adulte, en cellules souches multipotentes (Doetsch, 2002).

III.4/ Contrôle de la différenciation des cellules souches neurales.

Beaucoup de molécules extracellulaires régulant la différenciation des cellules souches ont été identifiées : la transduction du signal jusqu'au noyau s'effectue via l'action de facteurs de transcription qui activent des gènes cibles.

Les facteurs de transcription de type bHLH (*basic Helix Loop Helix*) sont impliqués dans le contrôle de la prolifération, la spécification et la différenciation de progéniteurs du

téleencéphale dans le système nerveux central en développement (Bertrand, 2002 ; Ross, 2003). Les cellules souches neurales adultes sont susceptibles d'utiliser les mêmes mécanismes moléculaires pour réguler leur activité et leur devenir.

Le facteur de transcription *Olig2* est impliqué dans le contrôle de l'auto-renouvellement et de la prolifération des cellules progénitrices et son absence perturbe leur capacité à se différencier en neurones et en oligodendrocytes (Hack, 2004). Dans la SVZ adulte, *Olig2* est principalement exprimé dans les cellules de type C. Sa surexpression favorise l'oligodendrogenèse au détriment de la neurogenèse (Hack, 2005). Une oligodendrogenèse peut donc avoir lieu chez l'adulte et celle-ci peut mettre en oeuvre les cellules de type C, normalement vouées à donner les neuroblastes (cellules de type A). Les cellules de la SVZ adulte sont en fait capables d'adopter deux destinées différentes selon leur migration. Si elles migrent le long de la RMS (tangentielllement) vers le bulbe olfactif, les cellules se différencient en interneurons olfactifs. Une migration radiale, qui permet de coloniser les régions du corps calleux, de la fimbria et du striatum, conduit les cellules de la SVZ à se différencier en oligodendrocytes (Menn, 2006). De plus, ce mécanisme d'oligodendrogenèse physiologique chez l'adulte est amplifié dans des cas pathologiques de démyélinisations (Menn, 2006).

Un autre facteur de transcription de type bHLH, *Mash1*, est exprimé dans les cellules de type C de la SVZ post-natale et adulte. Ce facteur joue un rôle dans la différenciation neuronale et oligodendrogliale (Parras, 2004 ; 2007). Les cellules de la SVZ possèdent donc une combinaison de facteurs de transcription qui agissent sur la prolifération, l'auto-renouvellement et le devenir de chaque cellule.

In vitro, les cellules issues de la SVZ et de l'hippocampe forment des neurosphères multipotentes sous l'influence de facteurs de croissance tels que le bFGF et/ou l'EGF (Gage, 1995 ; Gritti, 1996 ; Reynolds, 1992 ; Reynolds & Weiss, 1996). *In vivo*, les cellules de la SVZ de type B et C expriment le récepteur à l'EGF (Doetsch et al., 2002) qui possède une action mitogène *in vivo*, au niveau de la SVZ et l'hippocampe (Craig, 1996 ; Kuhn, 1997). La perfusion intra-ventriculaire d'EGF augmente la prolifération des cellules de type C et diminue la neurogenèse (Craig, 1996). *In vitro*, EGF convertit les progéniteurs neurogéniques en cellules souches multipotentes (Doetsch, 2002). En outre, si le bFGF favorise la neurogenèse dans le bulbe olfactif et dans l'hippocampe, l'EGF, au contraire, induit une différenciation gliale (Kuhn, 1997). Récemment, un rôle fonctionnel de l'EGF dans la signalisation régulant la myélinisation a été démontré, via la mobilisation des progéniteurs $NG2^+$ $Mash1^+$ $Olig2^+$ (Aguirre, 2007).

IGF-1 (*Insulin-Like Growth Factor-1*) est un polypeptide possédant des caractéristiques structurales similaires à l'insuline produit dans de nombreux tissus de l'organisme, notamment dans le cerveau adulte de rat au niveau de l'hippocampe, du bulbe olfactif et des cellules épendymaires (Marks, 1991a et 1991b). Chez la souris, la surexpression de IGF-1 conduit au développement de cerveaux de plus grosse taille, caractérisés par un plus grand nombre de neurones, et hyper-myélinisés (Carson, 1993 ; D'Ercole, 1996 ; Ye, 1996 ; Dentremont, 1999 ; O'Kusky, 2000). A l'inverse l'inactivation du gène codant l'IGF-1 provoque un retard dans la croissance cérébrale, une diminution du nombre d'oligodendrocytes et une hypo-myélinisation du système nerveux central (Beck, 1995 ; Ye, 2002).

Enfin, le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) intervient également dans la spécification des cellules souches neurales adultes. Au niveau de la SVZ, 80% des cellules souches (cellules de type B, GFAP⁺) expriment le récepteur PDGFR α (Jackson, 2006). Cette sous-population de cellules souches est capable de générer des neurones ou des oligodendrocytes. L'expression du récepteur au PDGF est indispensable pour l'oligodendrogenèse, mais pas pour la neurogenèse. Au contraire, son activation excessive par l'injection de PDGF *in vivo* suffit à induire la prolifération des cellules B PDGFR α ⁺ et à permettre une hyperplasie, voire l'apparition d'un gliome (Jackson, 2006). Cependant, ces cellules PDGFR α ⁺, dont une partie est NG2⁺, pourraient en réalité être des cellules de type C, voire des OPCs (Kesari & Stiles, 2006). Ces cellules sont en effet les cellules réactives du cerveau et présentent des caractéristiques de cellules souches (Ligon, 2006).

SHH (*Sonic Hedgehog*) est un facteur sécrété connu pour son action de ventralisation du tube neural (Jessell & Sanes, 2000). Il augmente la prolifération cellulaire et la neurogenèse dans les zones neurogéniques de la SVZ et de la SGZ, et agit en synergie avec l'EGF. Cette voie de signalisation régule l'auto-renouvellement des cellules souches *in vivo* et *in vitro* et contrôle la production de neurones (Lai, 2003 ; Ahn & Joyner, 2005 ; Palma, 2005). Dans l'embryon, la différenciation gliale apparaît après la différenciation neuronale dans les zones ventrale et dorsale du tube neural (Rowitch, 2004). Elle est directement contrôlée par SHH et implique l'expression des facteurs de transcription Olig2 et Nkx2.2 (Zhou, 2001 ; Nery, 2001). Cependant, une voie alternative indépendante de SHH existe : l'injection de FGF-2 dans les ventricules latéraux du cerveau antérieur embryonnaire chez la souris permet l'expression de Olig2 et du récepteur au PDGF du côté dorsal, sans induire l'expression de SHH. La co-injection de FGF-2 et de cyclopamine, un inhibiteur de Shh, n'atténue pas l'induction d'Olig2 et PDGFR α , ce qui suggère que l'effet de FGF-2 est indépendant de la voie de signalisation de SHH (Naruse, 2006).

Notch est un récepteur interagissant avec les membres de la famille de ligands Serrate/Jagged (Lindsell, 1995). La signalisation Notch active les gènes de la famille Hes (*Hairy Enhancer of Split*) (Kageyama & Ohtsuka, 1999) qui codent des facteurs de transcription de type bHLH. Ces facteurs Hes sont responsables de la répression transcriptionnelle de gènes pro-neuraux dans les progéniteurs neuraux, tels que les gènes de la famille Ngn (*Neurogenin*) (Castella, 1999 ; Cau, 2000) : l'activation de la voie Notch inhibe indirectement la différenciation neuronale, *via* l'action inhibitrice de ces facteurs de transcription Hes. De ce fait, des cellules exprimant une forme constitutivement active de Notch se différencient préférentiellement en cellules gliales (Nye, 1994 ; Bao & Cepko, 1997). L'activation du récepteur Notch induit l'expression des gènes de la famille Hes et du gène *Shh* via l'activation de signaux cytoplasmiques, comprenant la serine/thréonine kinase AKT et le facteur de transcription STAT3, favorisant la survie des cellules souches neurales (Androutsellis-Theotokis, 2006).

La voie de signalisation Wnt, dont le médiateur principal est la β -caténine, est impliquée dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire au cours du développement du système nerveux central. Les invalidations de *Wnt1* et de *Wnt3A* conduisent à des malformations du cervelet, de la moelle épinière (Ikeya, 1997) et à la perte totale de l'hippocampe (Lee, 2000). Ces défauts sont dus à la perturbation de la prolifération des cellules souches et progénitrices de la zone ventriculaire au cours du développement (Dickinson, 1994). Chez la souris, l'expression d'une forme constitutivement active de la β -caténine dans les précurseurs neuroépithéliaux (sous le contrôle du promoteur du gène *nestine*), conduit au développement de cerveaux de grosse taille, présentant une surface corticale plus importante et des ventricules latéraux élargis (Chenn & Walsh, 2002). La population de précurseurs est plus importante car ces cellules entrent de nouveau en prolifération au lieu de se différencier. Au cours du développement cortical, la signalisation Wnt inhibe l'auto-renouvellement des précurseurs corticaux et favorise la différenciation neuronale, même en présence de FGF (Hirabayashi, 2004), et ce au détriment de l'oligodendrogenèse (Muroyama, 2004). Ceci suggère que la signalisation Wnt joue un rôle spécifique selon le stade de développement.

Il existe ainsi une coordination de l'identité positionnelle et temporelle de cellules souches neurales (Panchision & McKay, 2002) (*figure 17*). Les mécanismes contrôlant la transition entre la neurogenèse et la gliogenèse ne sont pas totalement connus, et notamment, la coordination entre l'inhibition de l'une et l'activation de l'autre. Les facteurs de transcription NFIA et NFIB sont nécessaires et suffisants à la spécification gliale dans les progéniteurs

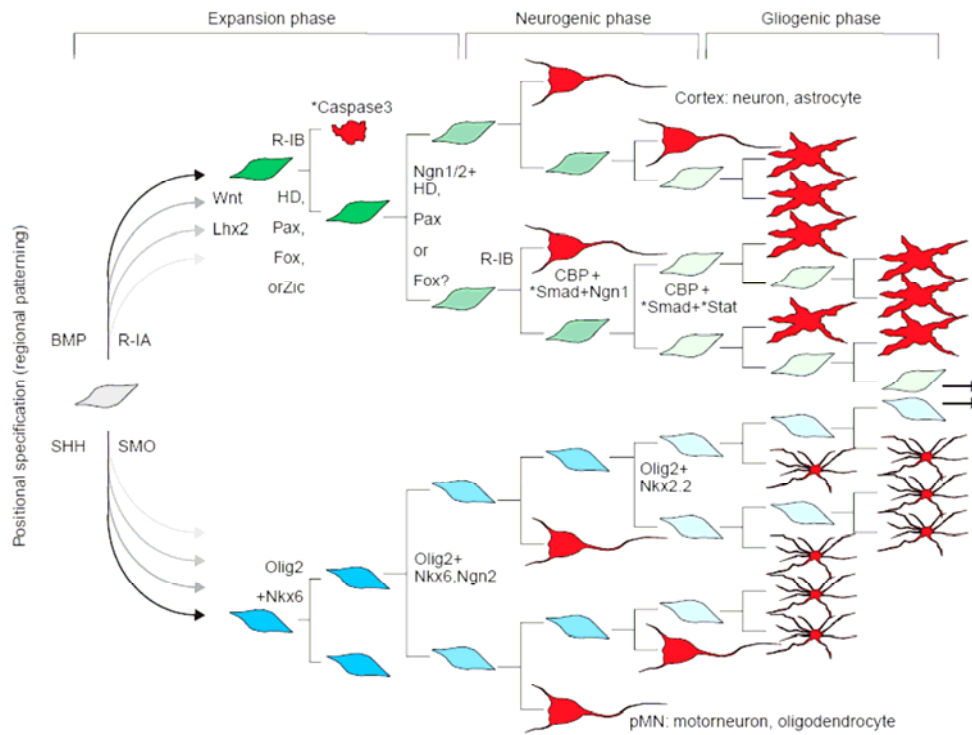


Figure 17 : Coordination de l'identité spatio-temporelle des cellules souches neurales.

(Panchision & McKay, 2002)

La concentration de morphogènes sécrétés spécifie les cellules souches : il y a induction dorsale et ventrale à travers les signalisations BMP/BMP-IA et SHH/SMO, respectivement. La signalisation Wnt intervient également dans l'identité dorsale et la prolifération des cellules soumises au signal BMP. Ces morphogènes favorisent l'auto-renouvellement cellulaire et inhibent la différenciation notamment via les facteurs de transcription spécifiques de l'identité de position (par exemple Pax, Fox, facteurs à doigt de zinc, à homéodomaine). L'arrêt du cycle cellulaire se produit par des processus actifs, par exemple lorsque l'activation du récepteur BMP-IB atteint un seuil critique. Les cellules souches passent par des états de transition qui déterminent leur différenciation en réponse aux signaux extracellulaires. Les morphogènes interviennent dans cette spécification en induisant l'expression des facteurs de types bHLH neurogéniques (Math1/2, Ngn1/2, Mash1/3, NeuroD), puis anti-neurogéniques (Nkx2.2, Hes5). La signalisation anti-neurogénique Notch favorise l'auto-renouvellement des cellules souches (cellules sombres) mais plus tard, induit l'état de précurseur gliogénique (cellules claires). La combinaison des facteurs de transcription qui spécifient l'identité positionnelle et temporelle permet de générer les types de cellules distincts.

Le schéma retrace la progression temporelle de deux types de précurseurs spécifiés positionnellement : dans le domaine pMN (*motor neuron progenitor domain*) de la moelle épinière ventrale, les oligodendrocytes succèdent aux moto-neurones, tandis que dans le cortex, les astrocytes succèdent aux neurones corticaux. La population de cellules souches diminue après naissance, peut-être par divisions symétriques des précurseurs gliaux.

embryonnaires de la moelle épinière *in vivo*, mais, à la différence des effecteurs de la voie Notch, tels que les gènes HES, ils ne sont pas suffisants pour inhiber la neurogenèse (Deneen, 2006). Néanmoins, les effecteurs de la voie Notch sont incapables de provoquer la spécification gliale en l'absence de NFIA. NFIA est requis pour la lignée oligodendrocytaire car ce facteur de transcription est essentiel au maintien de l'entretien d'expression d'Olig2 (Lu, 2002 ; Zhou & Anderson, 2002). Paradoxalement, lors de stades plus tardifs, NFIA/B favorisent la différenciation astrocytaire terminale. Ce double rôle séquentiel exige qu'un mécanisme supprime la fonction de NFIA dans les précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs). Ceci est réalisé par une interaction de NFIA avec Olig2, abolissant la spécification astrocytaire (Deneen, 2006).

III.5/ Oligodendrogenèse.

L'oligodendrogenèse a lieu durant l'embryogenèse tardive et à des stades post-natals précoces. La majorité des progéniteurs progressent à travers une série d'étapes morphologiquement et antigéniquement distinctes, dont le stade ultime est la capacité de myélinisation (*figure 18*).

Dans le tube neural embryonnaire des vertébrés, les gènes de la lignée oligodendrocytaire Olig1 et Olig2 sont co-exprimés dans les progéniteurs neuraux et leur expression est régulée par SHH (Lu, 2000). Chez la souris, Olig1 et Olig2 sont exprimés dès E8,5 dans la moelle épinière (Lu, 2000 ; Zhou, 2000) dans la région ventrale, connue pour être à l'origine de moto-neurones et de la majorité des précurseurs d'oligodendrocytes. Chez la souris, l'expression ectopique de Olig1 favorise l'oligodendrogenèse au détriment de la survie neuronale dans le cortex en développement (Lu, 2001) tandis que l'expression ectopique d'Olig2 génère des précurseurs oligodendrogliaux (OPCs, *oligodendrocyte precursor cells*) (Zhou, 2001). Tandis que Olig1 joue un rôle dans le développement et la maturation des oligodendrocytes, Olig2 est exigé pour la spécification des progéniteurs en oligodendrocytes et en moto-neurones dans la moelle épinière (Lu, 2002). Olig2, qui agit comme un répresseur transcriptionnel, intervient dans la spécification en moto-neurone par son action conjointe à celle d'un autre facteur de type bHLH, le facteur proneural Ngn2 dans le tube neural ventral (Mizuguchi, 2001). De plus, dans le télencéphale, Olig2 est essentiel au développement des neurones cholinergiques du striatum (Furusho, 2006).

L'expression du marqueur Nkx2.2 participe également à la spécification oligodendrocytaire, puisque l'apparition d'oligodendrocytes matures est fortement réduite sur l'ensemble de l'axe rostro-caudal chez les animaux mutants dénués de Nkx2.2, tandis que la

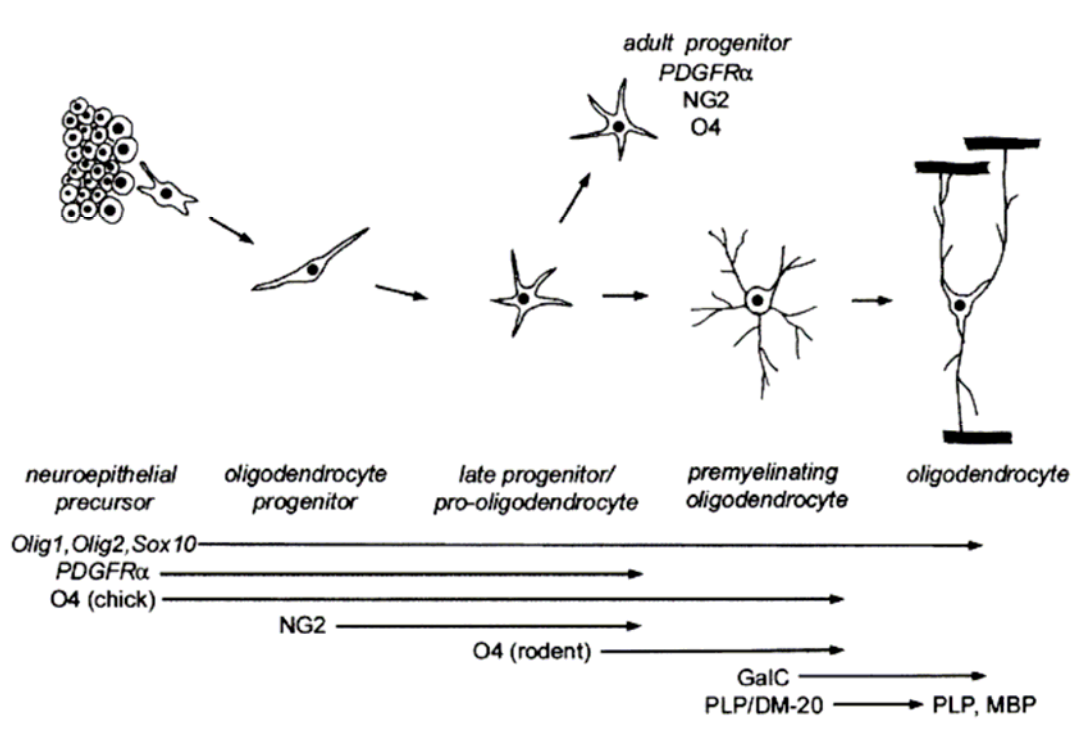


Figure 18 : Les différentes étapes de l'oligodrogenèse. (Woodruff, 2001)

Les progéniteurs oligodendrocytaires sont spécifiés dans le neuroépithélium. Le précurseur neuroépithélial, ou pré-progénéteurs, correspond aux cellules de type C chez l'adulte. Les progéniteurs d'oligodendrocytes sont des cellules bipolaires qui migrent et prolifèrent. La majorité des progéniteurs se différencient en oligodendrocyte pré-myélinisant avant de mûrir en oligodendrocytes capables de myélinisation. D'autres persistent dans le système nerveux central adulte comme une population de cellules progénitrices adultes proliférant lentement. Quelques marqueurs de la lignée sont indiqués.

PDGF, *platelet-derived growth factor* ; NG2, protéoglycane chondroïtine-sulfate ; GalC, galacto-cérébroside ; PLP, *proteolipid protein* ; MBP, *myelin basic protein*.

population astrocytaire reste inchangée (Briscoe, 1999).

Les progéniteurs oligodendrogliaux expriment le récepteur au PDGF α (Hall, 1996 ; Tekki-Kessarlis, 2001) et l'abolition du gène PDGF α réduit de 90% le nombre d'oligodendrocytes chez la souris (Fruttiger, 1999).

Chez la souris, les premières cellules progénitrices d'oligodendrocytes (OPCs) sont identifiées dans la moelle épinière ventrale à E12.5 et dans le cerveau antérieur ventral à E13.5 par l'expression des marqueurs spécifiques PDGFR α , Olig1 et Sox10 (Pringle & Richardson, 1993 ; Tekki-Kessarlis, 2001). Les OPCs plus tardifs expriment également les marqueurs NG2 et O4 (Rowitch, 2004). Les OPCs matures pourront quitter le cycle cellulaire et devenir des oligodendrocytes myélinisants, qui expriment la MBP (*Myelin Basic Protein*) et la PLP (*proteolipid protein*) (Rowitch, 2004).

Certains progéniteurs persistent dans le système nerveux central adulte et forment une population de cellules progénitrices d'oligodendrocytes adultes qui se divisent lentement (Woodruff, 2001). Les OPCs adultes, présents dans tout l'encéphale, représentent la population majeure de cellules en cycle en dehors des régions neurogéniques (Dawson, 2003).

Chez l'adulte, les oligodendrocytes matures, Olig2⁺, proviennent de progéniteurs neuraux de la zone ventriculaire (VZ), qui, une fois engagé dans la voie oligodendrogliale, migrent dans toutes les régions du système nerveux central sous la forme de précurseurs prolifératifs (OPCs). Après une différenciation terminale, ces OPCs généreront des oligodendrocytes capables de myéliniser les axones neuronaux (Rowitch, 2004). Dans le cerveau adulte des rongeurs, dans la zone sous-ventriculaire (SVZ), une sous-population de cellules de type B et de type C exprime Olig2 (Hack, 2005 ; Menn, 2006). L'exposition à des mitogènes tels que l'EGF ou le PDGF stimule la prolifération des cellules de type C Olig2⁺ en amplification transitoire (Jackson, 2006).

Bien qu'Olig1, Olig2, Sox10 et PDGFR α soient exprimés dans la même région de la moelle épinière en développement, leur chronologie d'apparition diffère (Lu, 2000 ; Zhou, 2000). Chez la souris, Olig1, Olig2 et Sox10 sont exprimés dans la moelle épinière dans le neuroépithélium ventral entier, à l'exclusion du plancher, à E9.5. A E12-E13, leurs domaines d'expression est limité à une bande qui se superpose au profil d'expression de PDGFR α , du côté dorsal du domaine d'expression de Nkx2.2 (Woodruff, 2001). Peu après, des cellules Olig1/2⁺ Sox10⁺ PDGFR α ⁺ apparaissent au niveau de la zone ventriculaire (VZ). Dans le télencéphale, les quatre gènes sont exprimés dans le neuroépithélium à la limite entre l'hypothalamus ventral antérieur et l'éminence ganglionnaire intermédiaire au moment où les

précurseurs d'oligodendrocytes $PDGFR\alpha^+$ sont produits (Tekki-Kessaris, 2001). Cependant, le profil d'expression d'Olig2 est plus vaste, englobant entièrement le neuroépithélium de l'éminence ganglionnaire intermédiaire et de l'éminence ganglionnaire latérale (Tekki-Kessaris, 2001 ; Woodruff, 2001). Au niveau de la zone ventriculaire, Olig1 et Olig2 apparaissent plus tôt que $PDGFR\alpha$ et persistent plus longtemps, que ce soit dans la moelle épinière ou le télencéphale.

Dans la moelle épinière chez le rat à E18.5, les cellules qui migrent hors de la zone ventriculaire sont $Olig1^+/Olig2^+$ (Woodruff, 2001) $Nkx2.2^+$ (Xu, 2000). Dans le télencéphale, l'expression d'Olig2 persiste dans la zone ventriculaire ventrale après que les cellules $PDGFR\alpha^+$ aient disparues, et des cellules $Olig2^+$ émergent de la zone ventriculaire de l'éminence ganglionnaire latérale (Tekki-Kessaris, 2001). Enfin, les oligodendrocytes sont produits dans le cortex cérébral post-natal par des progéniteurs qui proviennent de la SVZ des ventricules latéraux (Levison & Goldman, 1993 ; Levison, 1999).

Une autre protéine de type bHLH, Mash1, est également impliquée dans l'oligodendrogenèse. Mash1 est exprimé par les progéniteurs dans le cerveau et la moelle épinière et joue un rôle majeur dans la neurogenèse (Casarosa, 1999 ; Helms, 2005). Cependant, Mash1 est aussi exprimé dans les OPCs du nerf optique et le télencéphale post-natal (Parras, 2004). En outre, le nombre d'OPCs du bulbe olfactif chez les souris nullizygotés $Mash1^{-/-}$ est moins important que chez les souris sauvages (Parras, 2004).

Dans le cerveau antérieur embryonnaire, Mash1 joue un rôle dans la spécification d'une sous-population d'OPCs à partir de progéniteurs multipotents, indépendamment du niveau de neurogenèse (Parras, 2007). Mash1 et Olig2 sont co-exprimés dans la zone ventriculaire (VZ) qui contient les cellules souches multipotentes et Mash1 est exprimé dans les OPCs aussitôt qu'ils sont identifiés dans la VZ par l'expression de $PDGFR\alpha$ et Olig1. À E12.5, la plupart des cellules $Olig1^+ PDGFR\alpha^+$ de la VZ expriment Mash1, ce qui suggère que Mash1 est présent dans les OPCs au moment de leur spécification. Mash1 est également exprimé par une grande fraction des OPCs qui ont migré. À E14.5, le nombre de cellules de la VZ $Olig1^+ Mash1^+$ est moins important, alors que la même proportion d'OPCs $PDGFR\alpha^+ Olig1^+$ en migration sont $Mash1^+$. Mash1 n'est donc pas exprimé par tout les OPCs précocement générés (Parras, 2007). Alors que Olig1 semble être restreint à la lignée oligodendrocytaire entre E11.5 et E13.5, Olig2 est exprimé dans toute la zone ventriculaire et sous-ventriculaire (SVZ) du cerveau antérieur ventral et est exprimé dans toutes les cellules $Mash1^+$. Une petite sous-population de cellules $Mash1^+ Olig2^+$ correspond aux OPCs $PDGFR\alpha^+$, alors qu'une autre sous-population

correspond aux précurseurs neuronaux β -III-tubulin⁺, et qu'une troisième sous-population n'exprime aucun marqueur spécifique et correspondrait aux progéniteurs multipotents (Parras, 2007). Chez les embryons murins *Mash1*^{-/-}, une importante sous-population d'OPCs qui apparaît dans le cerveau antérieur ventral entre E11.5 et E13.5 n'est pas produite et la plupart des OPCs précoces PDGFR α ⁺, Olig1/2⁺ sont absents entre E12.5 et E13.5. Mash1 est donc exigé pour la génération de la majorité des OPCs précoces. Néanmoins, le défaut de production d'OPC est transitoire puisque la population d'OPCs entre E13.5 et E14.5 est similaire à celle dans les embryons sauvages (Parras, 2007). Le télencéphale embryonnaire contient donc deux lignées génétiquement distinctes d'OPCs, l'une produite par des progéniteurs Mash1⁺ et qui prédomine initialement, l'autre étant issue des progéniteurs Mash1⁻ et qui est plus tardive.

L'expression ectopique de Mash1 dans le cortex embryonnaire, dans les progéniteurs télencéphaliques dorsaux, induit une expression ectopique de PDGFR α mais n'est pas suffisante pour activer un programme complet d'oligodrogenèse (Parras, 2007).

Après la naissance, les OPCs engendrent des oligodendrocytes myélinisant et des OPCs quiescents NG2⁺ (Nishiyama, 1996 ; Ligon, 2006). Les progéniteurs Mash1⁺ engendrent une sous-population des OPCs NG2⁺ adultes et des oligodendrocytes matures (Parras, 2007).

La majorité des oligodendrocytes se développent à partir de progéniteurs oligodendrogliaux originaires d'un sous-ensemble de précurseurs neuroépithéliaux ventraux. En effet, chez le rat, la culture indépendante des cellules issues de la moelle épinière ventrale et dorsale au stade E14 permet le développement d'oligodendrocytes seulement dans les cultures de cellules ventrales (Warf, 1991 ; Hall, 1996 ; Pringle, 1998). De la même façon, la capacité oligodendrogénique des cellules issues du télencéphale ventral au stade E15 (striatum) est plus grande que celle des cellules issues de télencéphale dorsal (cortex cérébral) (Tekki-Kessaris, 2001). Pour des étapes plus tardives (E17–18), les cellules issues de la moelle épinière dorsale ou du cortex cérébral engendrent de nombreux oligodendrocytes. Ainsi, que ce soit dans la moelle épinière ou le télencéphale, la majorité des progéniteurs d'oligodendrocytes proviennent du neuroépithélium ventral et migrent ensuite dans les régions dorsales.

Dans la moelle épinière, les progéniteurs d'oligodendrocytes PDGFR α ⁺ apparaissent d'abord dans une région très restreinte du neuroépithélium ventral, à E14 chez le rat et E12.5 chez la souris (Pringle & Richardson, 1993 ; Pringle, 1996). Dans le télencéphale en développement, il existe également un foyer ventral de cellules PDGFR α ⁺ au niveau de la limite entre l'hypothalamus antérieur et l'éminence ganglionnaire intermédiaire, apparaissant au stade E13 chez le rat et E11 chez la souris (Pringle & Richardson, 1993 ; Spassky, 1998 ; Tekki-Kessaris, 2001). La spécification des progéniteurs d'oligodendrocytes ventraux est

dépendante de la protéine sécrétée Shh, qui agit comme un morphogène via ses récepteurs *Patched* et *Smoothed*. Dans la moelle épinière et le cerveau, les précurseurs d'oligodendrocyte apparaissent à proximité des sources du signal Shh, signal exigé pour la production de l'oligodendrocyte (Tekki-Kessarlis, 2001). Néanmoins, l'inactivation du gène *Shh* n'abolit pas l'oligodendrogenèse, mais celle-ci est retardée (Cai, 2005).

Après l'apparition des cellules PDGFR α ⁺ dans la moelle épinière ventrale et le télencéphale, leur nombre augmente rapidement. Les cellules commencent à se disperser, d'abord au travers du côté ventral, puis du côté dorsal de la moelle épinière dorsale et du télencéphale (Pringle & Richardson, 1993 ; Tekki-Kessarlis, 2001). Les progéniteurs oligodendrocytaires sont capables de migrer sur des distances de plusieurs millimètres pendant le développement et ainsi de peupler la moelle épinière et cortex cérébral depuis leur point d'origine situé dans la moelle épinière ventrale et l'hypothalamus antérieur respectivement (Pringle, 1998 ; Woodruff, 2001).

Des oligodendrocytes se développent également à partir de progéniteurs oligodendrogliaux originaires d'un sous-ensemble de précurseurs neuroépithéliaux dorsaux. En l'absence des protéines à homéodomaines NKx6.1 et Nkx6.2, l'expression de Olig2 dans le domaine pMN de la moelle épinière ventrale est abolie et cette perte d'expression est associée à une déficience dans la génération des OPCs ventraux précoces (Cai, 2005 ; Vallstedt, 2005). L'apparition de marqueurs oligodendrogliaux tels que Sox10 et PDGFR α n'apparaissent qu'à E18.5, au lieu de E13.5 chez les souris Nkx6^{-/-}, et les OPCs demeurent en nombre restreints par rapport aux souris sauvages. Ces OPCs générés tardivement indépendamment de Nkx6 sont issus de la moelle épinière dorsale. Chez les souris Shh^{-/-}, l'ensemble de la moelle épinière présente un phénotype dorsal et la plupart des structures ventrales, notamment le domaine pMN, sont absentes (Cai, 2005). L'apparition d'OPCs Olig1⁺/2⁺ est possible de façon retardée par rapport à l'apparition ventrale des OPCs chez les souris sauvages. Ainsi, une seconde vague d'oligodendrogenèse, plus tardive, a lieu dans la moelle épinière dorsale, de façon indépendante à Nkx6 et Shh (**figure 19a**). Les OPCs générés dérivent d'une sous-population de progéniteurs neuraux Pax7⁺ Mash1⁺ des domaines progéniteurs d'interneurones dI3-dI5 (Cai, 2005 ; Vallstedt, 2005). Au niveau moléculaire, Shh et les membres de la famille BMP sont connus pour être respectivement l'inducteur et les répresseurs majeurs de l'oligodendrogenèse. La répression du signal BMP par le facteur Noggin, produit par la notochorde, pourrait intervenir en synergie avec Shh et Nkx6 au niveau de la moelle épinière ventrale. Au niveau de la moelle épinière dorsale, la génération d'OPCs pourrait résulter de l'action combinée de

différents FGFs et de la perte progressive de l'inhibition par les BMPs (Cai, 2005 ; Vallstedt, 2005).

De façon similaire, il existe une source dorsale d'OPCs dans le cerveau postérieur (Vallstedt, 2005). A E13.5, l'expression des facteurs Olig1 et Olig2 caractérise une sous-population de progéniteurs dorsaux Pax3⁺ Pax7⁺. Certaines cellules Olig1⁺ Olig2⁺ expriment également Sox10 ou PDGFR α /NG2, marqueurs de différents stades de l'oligodendrogenèse. Cette source dorsale d'OPCs est également indépendante du signal Nkx6 qui, dans le cerveau postérieur, est inhibiteur de l'oligodendrogenèse ventrale.

Dans le télencéphale, les OPCs sont en fait générés séquentiellement à partir de 3 domaines de la zone ventriculaire (Kessaris, 2006) (*figure 19b*). Les premiers OPCs sont générés à E12,5 à partir de l'éminence ganglionnaire médiane et l'entopédoncule antérieure du cerveau ventral. Ces OPCs colonisent entièrement l'encéphale embryonnaire. Une seconde vague d'oligodendrogenèse a lieu à E15,5 à partir des éminences ganglionnaires latérales et caudales. Enfin, la dernière vague d'oligodendrogenèse a lieu dans le cortex post-natal. La destruction d'une de ces sources est compensée par la présence des deux autres. Les trois populations sont redondantes, la première étant éliminée après la naissance.

Des programmes génétiques distincts, utilisant une combinaison particulière de facteurs de transcription, gouvernent les multiples origines de la spécification spatio-temporelle oligodendrogliale (Spassky, 2001 ; Chandran, 2003 ; Cai, 2005 ; Fogarty, 2005 ; Vallstedt, 2005 ; Kessaris, 2006 ; Richardson, 2006).

L'oligodendrogenèse est contrôlée par un réseau complexe de facteurs de transcription : les facteurs à homéodomaine Nkx2.2, Nkx6.1 et Nkx6.2 (Zhou, 2001 ; Cai, 2005 ; Vallstedt, 2005), les facteurs Sox8, Sox9, Sox10 (Wegner & Stolt, 2005), les facteurs à domaine basique hélice-boucle-hélice (bHLH) Olig1, Olig2 et Mash1 (Lu, 2002; Takebayashi, 2002; Zhou & Anderson, 2002 ; Parras, 2004). Parmi la famille Olig, Olig2 joue un rôle prédominant dans la spécification embryonnaire de la lignée oligodendrocytaire alors qu'Olig1 est nécessaire à la maturation des oligodendrocytes et à la réparation des lésions de type démyélinantes dans le cerveau adulte (Lu, 2001 ; 2002 ; Takebayashi, 2002 ; Arnett, 2004, Xin, 2005). Les cellules Olig2^{-/-} sont converties en astrocytes (Takebayashi, 2002 ; Zhou & Anderson, 2002). Cependant, les voies de signalisation médiées par les protéines kinases, qui contrôlent le fonctionnement des facteurs de transcription impliqués dans le développement neural, sont en grande partie inconnues. Récemment, la différenciation astrocytaire des progéniteurs neuraux du télencéphale murin embryonnaire, induite par le CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*), a été

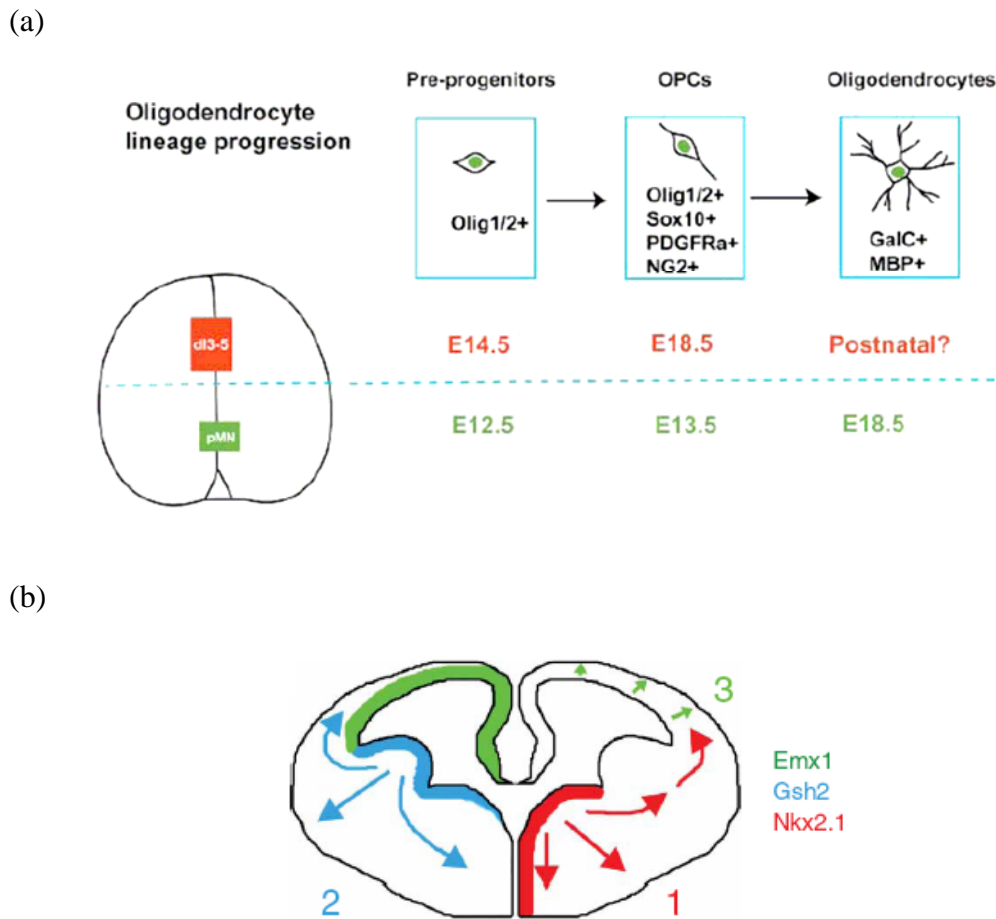


Figure 19 : Génération séquentielle des progéniteurs d'oligodendrocytes dans la moelle épinière et le télencéphale.

(a) Au niveau de la moelle épinière, la majorité des progéniteurs d'oligodendrocytes (OPCs) dérive du domaine ventral pMN. Une population minoritaire est également générée au niveau des domaines dI3-dI5 dorsaux, indépendamment de l'activité des facteurs Nkx6.1, Nkx6.2 et Shh. Les deux populations vont migrer et coloniser l'ensemble de la moelle épinière. La génération des OPCs dorsaux est décalée d'environ 2 jours par rapport aux progéniteurs ventraux et leur différenciation est également plus lente. (Cai, 2005)

(b) Dans le télencéphale, les premiers OPCs sont générés à E12,5 à partir de précurseurs Nkx2.2⁺ de l'éminence ganglionnaire médiane et l'entopédoncule antérieure de la zone ventriculaire ventrale. Ces OPCs colonisent entièrement l'encéphale embryonnaire. Une seconde vague d'oligodendrogenèse a lieu à E15,5 à partir de précurseurs Gsh2⁺ des éminences ganglionnaires latérales et caudales. Enfin, la dernière vague d'oligodendrogenèse a lieu dans le cortex post-natal à partir de précurseurs corticaux Emx1⁺. (Kessaris, 2006)

corrélée avec la phosphorylation d'Olig2 par la kinase AKT, qui stimule son exportation du noyau au cytoplasme (Setoguchi & Kondo, 2004).

La protéine kinase CK2 intervient également dans le contrôle de certains facteurs de transcription impliqués dans le développement neural.

Les membres de la famille Gro/TLE (*Groucho/Transducin-Like Enhancer of split*) sont des répresseurs de l'activité transcriptionnelle et jouent d'importants rôles au cours du développement, notamment dans le développement neural (Yao, 2000 ; Kobayashi, 2001 ; Muhr, 2001). Ils inhibent la neurogenèse et permettent le maintien de l'état indifférencié des cellules souches neurales. Gro/TEL1 est phosphorylé *in vivo* par la protéine kinase CK2 sur la Ser239, au niveau d'un domaine conservé chez tous les membres de la famille Gro/TEL (Nuthall, 2004). Gro/TEL1 inhibe la différenciation des progéniteurs neuraux corticaux et son activité anti-neurogénique nécessite la phosphorylation du résidu 239 (Nuthall, 2004).

Les facteurs de transcription de type bHLH peuvent également être phosphorylés et régulés par la protéine kinase CK2. La phosphorylation de Hes6 (*Hairy/Enhancer of split*) stimule la neurogenèse des progéniteurs neuraux embryonnaires en réprimant l'inhibition transcriptionnelle médiée par Hes1 (Gratton, 2003). L'abolition de la sérine 183 (résidu cible de CK2) conduit à la perte de la capacité neurogénique de Hes6 dans les progéniteurs neuraux corticaux (Gratton, 2003).

D'autre part, CK2 agit comme un régulateur positif de l'activité transcriptionnelle de Mash1 car la phosphorylation de Mash1 par CK2 augmente sa stabilité (Viñals, 2004). La diminution du niveau d'expression de CK2 β par la technique des ARNs interférants induit la réduction du niveau d'expression de Mash1, ce qui suggère une fonction CK2 β -dépendante sur le développement neural à travers les phosphorylations CK2 β -dépendante et la stabilité de Mash1 (Viñals, 2004).

IV/ Le concept de cellules souches cancéreuses.

L'auto-renouvellement est un phénomène crucial pour la fonction de cellule souche. Une telle cellule régule la balance entre auto-renouvellement et différenciation en fonction des stimuli environnants, notamment au cours du renouvellement tissulaire lors de la vie adulte. Les cellules souches partagent cette capacité d'auto-renouvellement avec les cellules cancéreuses. Plusieurs voies de signalisation qui sont normalement associées au développement des cellules souches sont réactivées dans les cellules cancéreuses. Ainsi, un dysfonctionnement des voies Wnt, Shh ou Notch est à l'origine de certains cancers (Brickman & Burdon, 2002 ; Reya 2001 ; 2005).

Une tumeur peut être vue comme un organe aberrant, initié par une cellule cancéreuse ayant acquis la capacité de proliférer de façon incontrôlée via l'accumulation de mutations. Dès lors, les principes de la biologie s'appliquant aux cellules souches peuvent s'employer pour comprendre comment les tumeurs se développent (Pardal, 2003) (*figure 20*). De nombreuses analogies existent en effet. Les progéniteurs qui dérivent des cellules souches normales et cancéreuses ont un grand potentiel de prolifération et la capacité de générer de nouveaux tissus. Ces tissus sont composés d'une population hétérogène de cellules ayant des caractéristiques phénotypiques différentes et des potentiels prolifératifs différents. De nombreuses tumeurs sont d'origine clonale (Fialkow, 1976), ce qui suggère que les cellules cancéreuses utilisent des processus analogues à ceux qui ont lieu durant l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches normales.

De nombreux types de cellules cancéreuses peuvent être organisés hiérarchiquement, allant de la cellule souche cancéreuse maligne, qui est quiescente mais possède un grand potentiel prolifératif, aux cellules cancéreuses différenciées dont la capacité proliférative est limitée, en passant par un stade de progéniteurs en prolifération rapide (Pardal, 2003). Ainsi, bien que l'hétérogénéité d'une tumeur puisse être le résultat d'une mutagenèse constante, elle peut également être due à une différenciation aberrante des cellules souches cancéreuses. Plusieurs types de tumeurs montrent un phénotype hétérogène qui reflète les différentes étapes de la différenciation ayant lieu normalement dans le tissu dont le cancer est issu. D'autre part, l'existence de telles cellules apporte un éclairage nouveau sur le phénomène des métastases. Les différences intrinsèques entre cellules souches cancéreuses et cellules cancéreuses non tumorigéniques pourraient expliquer que seules quelques rares cellules cancéreuses, les cellules souches cancéreuses, puissent se développer dans un organe différent de celui dont est issue la tumeur primaire (Pardal, 2003 ; Clarke, 2006).

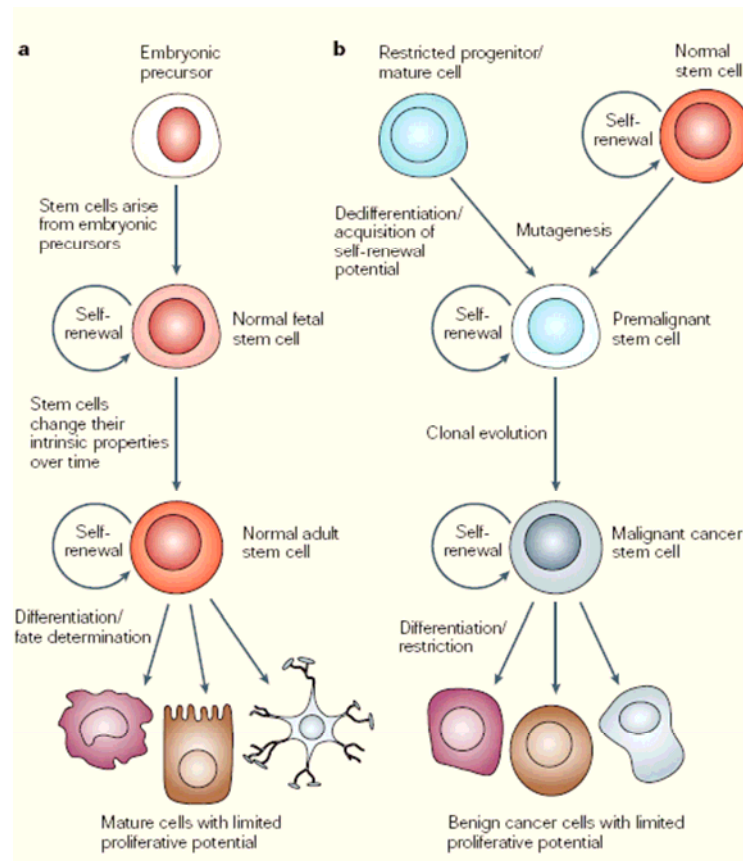


Figure 20 : Parallèle entre cellules souches et cellules souches cancéreuses. (Pardal, 2003)

(a) Les cellules souches somatiques normales proviennent de précurseurs embryonnaires pendant le développement fœtal. Ces cellules souches adultes permettent le maintien de l'homéostasie tissulaire.

(b) Les cellules souches cancéreuses peuvent être la résultante de la transformation d'une cellule souche somatique suite à l'accumulation de mutations génétiques, ou de celle d'une cellule progénitrice. Des mutations touchant une cellule différenciée peuvent également lui permettre d'acquérir les propriétés de cellule souche cancéreuse, et particulièrement l'acquisition d'un potentiel d'auto-renouvellement. Les cellules souches cancéreuses se propagent (expansion clonale) et sont sujettes à l'instabilité génomique. Elles se distinguent des autres cellules cancéreuses par leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en diverses cellules cancéreuses non tumorigéniques, au potentiel de prolifération limité. La progression de certains cancers peut être conduite par une minorité de cellules, les cellules souches cancéreuses, de même que la croissance des tissus normaux est conduite par des populations limitées de cellules souches somatiques.

Au cœur d'une tumeur, on détecte une population restreinte de cellules peu différenciées, relativement quiescentes, et à l'origine de la tumeur (Reya, 2001 ; Pardal, 2003). Une tumeur pourrait donc avoir comme origine une cellule souche cancéreuse. La caractérisation moléculaire de cette population de cellules souches cancéreuses est donc nécessaire car elle apporte l'espoir d'améliorer les thérapies anti-cancéreuses en éliminant de façon sélective ces cellules.

Au cours des dernières années, plusieurs équipes ont ainsi isolé des cellules cancéreuses pouvant se copier à l'identique ou produire toutes les autres cellules présentes dans la tumeur d'origine. Les premières cellules souches cancéreuses furent isolées chez des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (Lapidot, 1994 ; Bonnet & Dick, 1997). L'utilisation de marqueurs de surface a permis de distinguer les cellules souches leucémiques des autres cellules cancéreuses qui ont un potentiel de prolifération limité (Bonnet & Dick, 1997). Le concept de cellule souche cancéreuse a ensuite été transposé dans le cas de tumeurs solides comme le cancer du sein (Al-Hajj, 2003) et du cerveau (Singh, 2003).

L'hétérogénéité des cellules d'une tumeur mammaire humaine est mise en évidence par l'expression d'une variété de marqueurs de surface. Parmi eux, CD24 et CD44 sont des molécules d'adhésion et B38.1 est un marqueur spécifique des cancers mammaire et ovarien (Kufe, 1983 ; Uchida, 2000 ; Ahrens, 2001). En se basant sur l'expression de ses marqueurs de surface, les cellules tumorigéniques, CD44⁺ CD24^{-/low} B38.1⁻, sont distinguables des cellules non tumorigéniques (Al-Hajj, 2003). En effet, moins de 100 cellules avec ce phénotype sont capables de former des tumeurs chez la souris, alors que plusieurs dizaines de milliers de cellules cancéreuses sans ce phénotype sont incapables de former des tumeurs chez l'animal. La sous-population cellulaire tumorigénique peut être propagée sériellement : elle produit de nouvelles tumeurs qui contiennent des cellules tumorigéniques ainsi que les populations phénotypiquement diversifiées présentes dans la tumeur initiale (Al Hajj, 2003).

De même, toutes les cellules d'une tumeur cérébrale humaine ne sont pas équivalentes en terme de capacité à proliférer *in vitro*. La sous-population la plus apte possède des marqueurs de cellules souches neurales (Singh, 2003) comme la nestine (Lendahl, 1990) et CD133 (Uchida, 2000), qui est également un marqueur de cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (Yin, 1997). Cette sous-population, qui n'exprime aucun marqueur de cellules neurales différenciées, est également capable de générer des neurosphères multipotentes *in vitro* (Singh, 2003). Selon le type de tumeur cérébrale, cette population de cellules souches représente entre 1 et 25% du nombre de cellules cancéreuses.

Ces découvertes sont cruciales pour l'avenir des traitements anti-cancéreux. Le cancer du sein touche 10 à 20% des femmes dans les pays occidentaux et représente la 2^{ème} cause de décès par cancer chez la femme, après le cancer du poumon. Les tumeurs du cerveau quant à elles sont la principale cause de mortalité infantile par cancer et restent difficiles à traiter en dépit des avancées dans les traitements médicamenteux et chirurgicaux. Chez les adultes, la plupart des tumeurs cérébrales sont également parmi les plus sinistres, avec une résistance exceptionnelle à la plupart des thérapies.

La découverte des cellules souches cancéreuses signifie que seul un nombre restreint de cellules dans une tumeur ont la capacité de conduire à la croissance tumorale. Cela a d'importantes implications pour la thérapie anti-cancer (Pardal, 2003 ; Dirks, 2006) (*figure 21*) : les thérapies classiques cherchent en effet à tuer autant de cellules que possible dans la tumeur, en ciblant les cellules en prolifération rapide. Il ne s'agirait plus d'agir uniquement sur la population de cellules en croissance, mais également de cibler les cellules souches cancéreuses quiescentes à l'origine de rechutes. La caractérisation des cellules souches cancéreuses peut mener à améliorer le diagnostic et les thérapies en perfectionnant l'identification et le ciblage de ces cellules souches cancéreuses afin de pouvoir les détruire sélectivement, d'induire leur différenciation ou de prévenir le phénomène de métastase (Pardal, 2003). Les cellules souches cancéreuses étant capables d'auto-renouvellement et de différenciation, les voies de signalisation intervenant dans l'auto-renouvellement de ses cellules sont susceptibles de stimuler la prolifération et/ou de maintenir l'état de cellule souche. Les thérapies qui induisent la différenciation des cellules souches cancéreuses, ou qui inhibent même de façon transitoire le maintien de l'état indifférencié, devraient mener à l'épuisement du pool de cellules souches cancéreuses et à la conversion des cancers malins en tumeurs bénignes (Pardal, 2003).

Le marqueur CD133 a été proposé comme un indicateur de cellules souches/progénitrices pour les gliomes (Singh, 2004 ; Bao, 2006). L'analyse de gliomes humains montre que Olig2 est exprimé dans au moins 85% des cellules progénitrices CD133⁺ Ki67⁺ (marqueur de prolifération) tandis que les cellules Ki67⁺ représentent seulement 37% de la population Olig2⁺. Les cellules CD133⁺ représentent seulement 6% de la tumeur ; cependant, la quasi totalité (98%) d'entre elles sont Olig2⁺. Cependant, l'expression d'Olig2 n'est pas restreinte aux cellules progénitrices des gliomes. Enfin, toutes les cellules CD133⁺ ne sont pas Ki67⁺. Ceci suggère que les cellules souches Olig2⁺ représentent un état de transition entre les cellules souches (de type B) et les cellules en amplification transitoire (de type C)

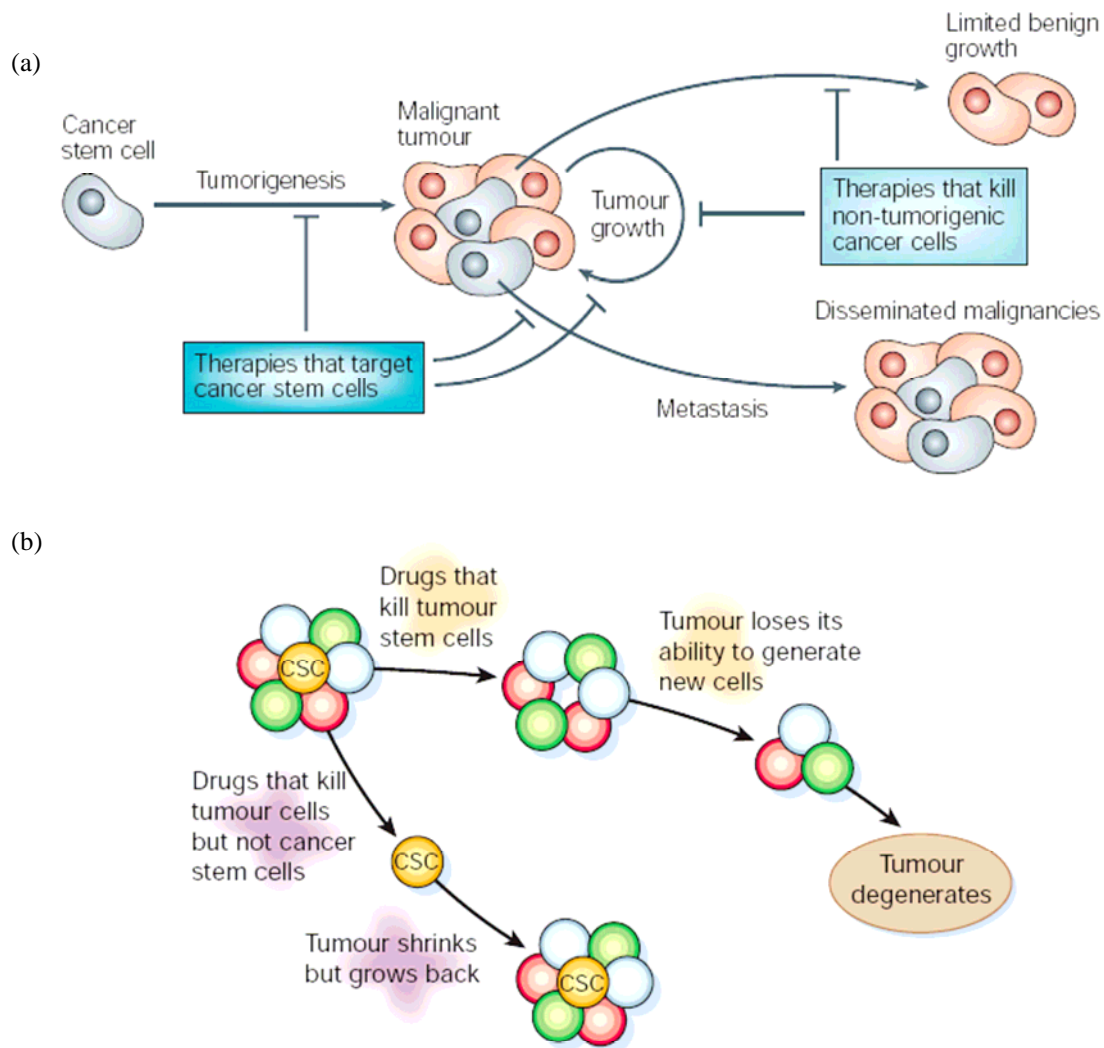


Figure 21 : Implications thérapeutiques de l'existence des cellules souches cancéreuses.

(a) Les cellules souches cancéreuses s'auto-renouvellent et se différencient, générant ainsi de nouvelles cellules souches cancéreuses, qui peuvent générer des métastases, ainsi qu'une population hétérogène non tumorigénique. Les cellules non tumorigéniques prolifèrent rapidement mais possèdent un potentiel de division limité. Les thérapies qui ciblent les cellules non tumorigéniques permettent une régression de la tumeur mais ne guérissent pas le patient car les cellules souches cancéreuses peuvent régénérer la tumeur. Une meilleure caractérisation des cellules souches cancéreuses permettra le développement de thérapies ciblées, éliminant ces cellules, induisant leur différenciation ou limitant leur dissémination. (Pardal, 2003)

(b) Les thérapies conventionnelles ne permettent pas l'élimination des cellules souches cancéreuses, ce qui expliquerait les rechutes fréquentes. Si de nouvelles thérapies ciblant les cellules souches cancéreuses peuvent être mises en place, la tumeur ne pourra plus maintenir sa croissance et dégénèrera. L'alliance des deux thérapies permettrait dans un premier temps d'éliminer une grande partie de la masse tumorale, puis d'évoluer vers une rémission totale du patient. (Reya, 2001)

dans le cerveau normal (Ligon, 2007).

Le gène *p21*, inhibiteur du cycle cellulaire, joue un rôle important dans le maintien de l'état quiescent des cellules souches du sang (Cheng, 2000) et du cerveau (Kippin, 2005). De plus, la régulation de la prolifération des cellules souches neurales par P53 est en partie médiée via P21 (Meletis, 2006). L'inactivation du gène *p21* résulte en une augmentation du taux de prolifération des cellules souches neurales dans le télencéphale adulte (Kippin, 2005). Le gène *p21* étant la cible de la répression du facteur de transcription Olig2, celui-ci est directement relié à la machinerie régulatrice du cycle cellulaire dans les cellules souches/progénitrices neurales normales et cancéreuses (Ligon, 2007). Chez la souris, Olig2 est nécessaire à l'apparition de gliomes (Ligon, 2007).

Au niveau de la SVZ, la majorité des cellules souches (cellules de type B, GFAP⁺) expriment le récepteur PDGFR α (Jackson, 2006). L'injection de PDGF *in vivo* induit la prolifération des cellules B PDGFR α ⁺ et permet une hyperplasie, voire l'apparition d'un gliome (Jackson, 2006). Cependant, une autre population cellulaire pourrait être à l'origine des gliomes : il pourrait s'agir de progéniteurs primaires (cellules de type C) voire des progéniteurs d'oligodendrocytes (Kesari & Stiles, 2006). La majorité des cellules en prolifération dans le système nerveux central adulte sont NG2⁺. Ces cellules, localisées dans des régions coïncidant avec les zones d'apparition des gliomes, sont également PDGFR α ⁺ et Olig2⁺ et révèlent des caractéristiques de cellules souches (Ligon, 2006). Enfin, la totalité des gliomes humains sont Olig2⁺, quelque soit le grade de la tumeur, alors que le marqueur est absent des tumeurs cérébrales d'origine non neurale (Ligon, 2004).

Il est apparu dans cet exemple qu'il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques des gliomes, basé sur la compréhension complète des mécanismes biologiques de gliogenèse (Rich & Bigner, 2004).

PARTIE II :
La protéine kinase CK2.

I/ Les protéines kinases.

L'approche génétique chez les mammifères a permis de décrypter quels étaient les facteurs extracellulaires (facteurs de croissance, cytokines) qui contrôlent l'activité transcriptionnelle liée aux différentes potentialités des cellules souches (voir partie I). Les voies de signalisation qui font intervenir des modifications post-traductionnelles impliquant en grande partie des phosphorylations, font le lien entre l'environnement extracellulaire et la réponse cellulaire.

La phosphorylation des protéines représente un mécanisme de régulation contrôlant pratiquement tous les aspects de la vie cellulaire (Cohen, 2002a). Cette réaction covalente est assurée par les protéines kinases, qui participent, au sein de réseaux, à l'intégration de signaux essentiels pour le contrôle de la division, de la différenciation et de la mort des cellules (Hunter, 1992). Les protéines kinases régulent l'activité transcriptionnelle, l'apoptose, la progression dans le cycle cellulaire et la prolifération, les réarrangements du cytosquelette, la différenciation, la mobilité cellulaire, etc (Cohen, 2002a).

Les kinases catalysent la réaction suivante :



Selon la nature du groupe phosphorylé sur la protéine (R-OH), ces enzymes sont classées en protéines sérine/thréonine kinases et en protéines tyrosine kinases. L'étude du génome humain a conduit à l'identification de 518 gènes de protéine kinase - dont 40 sont atypiques - qui correspondent à environ 2% du génome humain. La famille des protéines kinases (**figure 22**), incluant 385 sérine/thréonine kinases, 90 tyrosine kinases et 43 protéines proches des tyrosine kinases, est, en taille, la seconde famille d'enzyme après celle des protéases (Manning, 2002).

En raison de leur grande diversité d'actions, les protéines kinases doivent être rigoureusement régulées : l'activité aberrante de ces enzymes génère des maladies comme le cancer ou le diabète, mais aussi à des dysfonctionnement nerveux, cardiovasculaire, inflammatoires ou auto-immunitaires (Manning, 2002). Les cartes chromosomiques révèlent ainsi que 244 gènes codant des kinases correspondent à un locus associé à une maladie ou à des amplicons retrouvés fréquemment dans les tumeurs (Manning, 2002). De plus, la dérégulation par mutation ou surexpression des protéines kinases est une caractéristique des cellules cancéreuses (Hanahan, 2000). À ce titre, les protéines kinase constituent une fraction importante des oncogènes actuellement connus. Des efforts considérables ont donc été réalisés pour déterminer les fonctions physiologiques et pathologiques des voies de signalisation des

protéines kinases. Ces enzymes, de part le fait que leur mutation ou leur dérégulation sont à l'origine de maladies humaines, représentent des cibles thérapeutiques très pertinentes (Cohen, 2002b).

Page suivante :

Figure 22 : Le kinome humain. (Manning, 2002)

L'arbre phylogénétique de la super famille des protéines kinases humaines illustre l'homologie de séquence entre les domaines catalytiques. La plupart des protéines kinases ont des domaines catalytiques analogues en séquence et structure et appartiennent à de petites familles de séquences très apparentées, qui font souvent partie de plus grands groupes. Les sept groupes majeurs sont étiquetés et sont colorés distinctement. Les autres kinases, dont fait partie la protéine kinase CK2, sont situées au centre de l'arbre, en gris. Les 13 familles de protéines kinases atypiques, dont les membres, malgré une activité kinase démontrée, ne présentent pas (ou peu) d'homologie de séquence pour le domaine kinase ne sont pas présentées. Quelques kinases atypiques possèdent néanmoins un domaine catalytique présentant une homologie structurale avec celui des kinases eucaryotes.

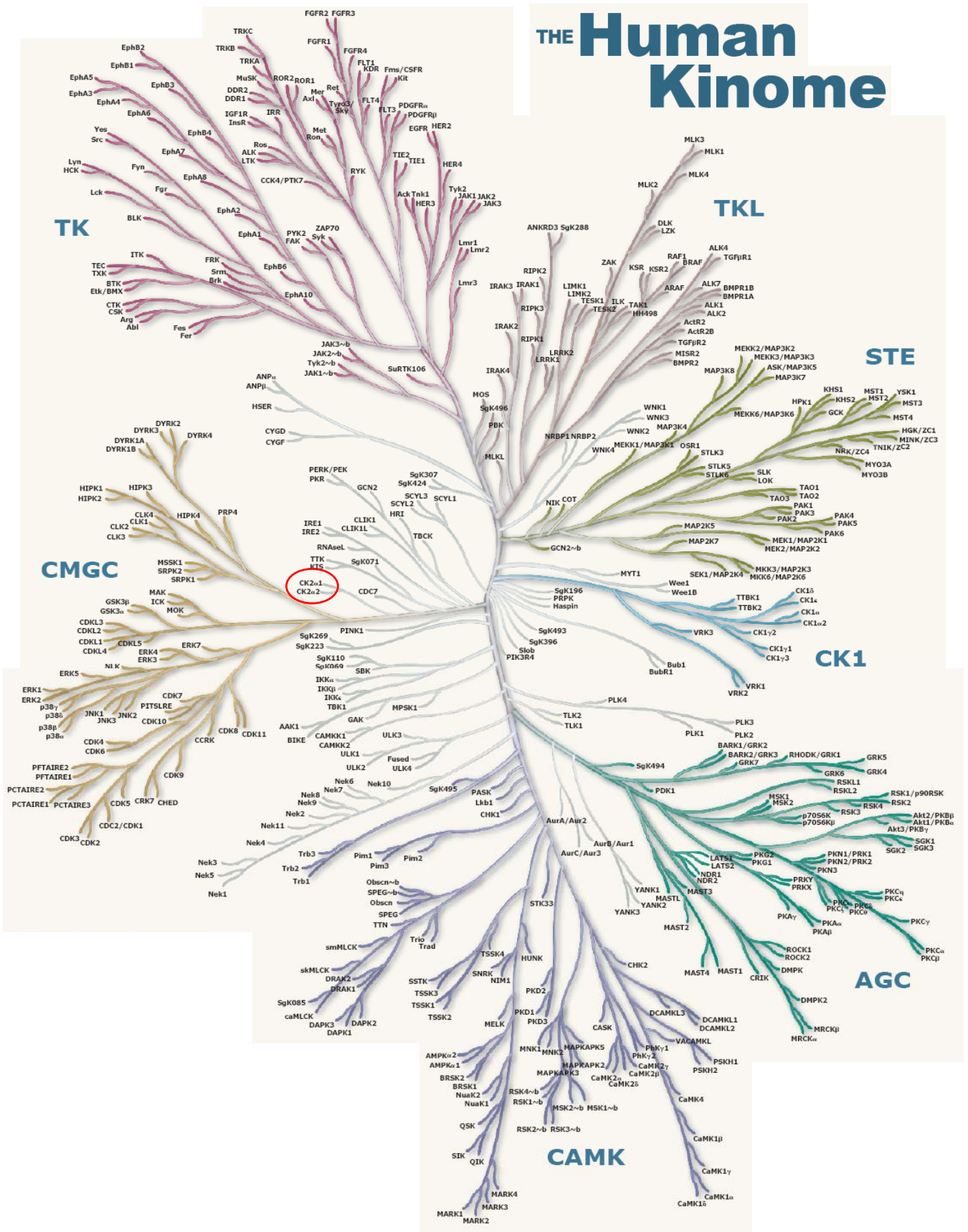
Group names

AGC Containing PKA, PKG, PKC families ; **CAMK** Calcium/calmodulin-dependent protein kinase ; **CK1** Casein kinase 1 ; **CMGC** Containing CDK, MAPK, GSK3, CLK families ; **STE** Homologs of yeast Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 kinases ; **TK** Tyrosine kinase ; **TKL** Tyrosine kinase-like.

Kinase names

ActR Activin receptor ; **ALK** (TK group) Anaplastic lymphoma kinase ; **ALK** (TKL group) Activin-like receptor kinase ; **AMPK** Adenosine monophosphate-activated protein kinase ; **Aur** Aurora ; **BARK** b-adrenergic receptor kinase ; **BLK** B lymphocyte tyrosine kinase ; **BMPR** Bone morphogenetic protein receptor ; **BMX** Bone marrow tyrosine kinase gene in chromosome X ; **BRD** Bromodomain kinase ; **BRSK** Brain-selective kinase ; **CaMK** Calcium/calmodulin-dependent protein kinase ; **CAMKK** CaMK kinase ; **CCK-4** Colon carcinoma kinase-4 ; **CDK** Cyclin-dependent kinase ; **CDKL** Cyclin-dependent kinase-like ; **CK** Casein kinase ; **CLK** Cdc2-like kinase ; **CSFR** Colony-stimulating factor receptor ; **DAPK** Death-associated protein kinase ; **DCAMKL** Doublecortin- and CaMK-like ; **DDR** Discoidin domain receptor ; **DMPK** Dystrophin myotonia protein kinase ; **DNAPK** DNA-activated protein kinase ; **DRAK** DAPK-related apoptosis-inducing kinase ; **DYRK** Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase ; **EEF2K** Eukaryotic elongation factor-2 kinase ; **EGFR** Epidermal growth factor receptor ; **Eph** Ephrin receptor ; **ERK** Extracellular signal-regulated kinase ; **FAK** Focal adhesion kinase ; **FGFR** Fibroblast growth factor receptor ; **FRK** Fos-regulatory kinase ; **GRK** G protein-coupled receptor kinase ; **GSK** Glycogen synthase kinase ; **HIPK** Homeodomain-interacting protein kinase ; **IKK** I-kB kinase ; **ILK** Integrin-linked kinase ; **InsR** Insulin receptor ; **IRAK** Interleukin-1 receptor-associated kinase ; **IRE** Inositolrequiring ; **IRR** Insulin receptor-related ; **JAK** Janus kinase ; **JNK** c-Jun NH2-terminal kinase ; **KSR** Kinase suppressor of Ras ; **LATS** Large tumor suppressor ; **LIMK** Lim domain-containing kinase ; **LMR** Lemur kinase ; **LRRK** Leucine rich-repeat kinase ; **MAP2K** Mitogen-activated protein kinase kinase ; **MAP3K** Mitogen-activated protein kinase kinase kinase ; **MAPK** Mitogen-activated protein kinase ; **MAPKAPK** MAPK-activated protein kinase ; **MARK** Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase ; **MAST** Microtubule-associated serine-threonine kinase ; **MLCK** Myosin light chain kinase ; **MLK** Mixed lineage kinase ; **MNK** MAPK-interacting kinase ; **MRCK** Myotonic dystrophy-related CDC42-binding kinase ; **MSK** Mitogen- and stress-activated protein kinase ; **MuSK** Muscle-specific kinase ; **NDR** Nuclear, Dbf2-related kinase ; **NIK** Nuclear factor kB-inducing kinase ; **PAK** p21-activated kinase ; **PDGFR** Platelet-derived growth factor receptor ; **PDHK** Pyruvate dehydrogenase kinase ; **PDK** Phosphoinositide-dependent kinase ; **PhK** Phosphorylase kinase ; **PIKK** Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase ; **PKA** Protein kinase A ; **PKB** Protein kinase B ; **PKC** Protein kinase C ; **PKD** Protein kinase D ; **PKG** Protein kinase G ; **PKN** Protein kinase N ; **PKR** Protein kinase, double-stranded RNA-dependent ; **PRK** Protein kinase C-related kinase ; **PSKH** Protein serine kinase H ; **RIPK** Receptor-interacting protein kinase ; **ROCK** Rho-associated, coiled-coil-containing kinase ; **ROR** Regeneron orphan receptor ; **RSK** Ribosomal protein S6 kinase ; **RSKL** RSK-like ; **Sgk** Sugen kinase ; **SGK** Serum and glucocorticoid-regulated kinase ; **SRPK** Serine-arginine splicing factor protein kinase ; **SYK** Spleen tyrosine kinase ; **TAK** Transforming growth factor-b-activated kinase ; **TEC** Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma ; **TESK** Testis-specific kinase ; **TGFbR** Transforming growth factor-b receptor ; **TIE** Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF repeats ; **TIF1** Transcriptional intermediary factor 1 ; **TLK** Tousled-like kinase ; **TSSK** Testis-specific serine.

THE Human Kinome



(<http://www.kinase.com/human/kinome>)

II/ La protéine kinase CK2.

II.1/ Généralités.

La protéine kinase CK2 (acronyme de Caséine Kinase 2) est une sérine-thréonine kinase ubiquitaire conservée au cours de l'évolution (Allende & Allende, 1995 ; Litchfield, 2003 ; Meggio, 2003). L'holoenzyme tétramérique est composée de deux sous-unités catalytiques α et/ou α' (38-44 kDa) et d'un dimère de sous-unités régulatrices β (24-29 kDa) (Cochet, 1983). La structure cristallographique (Niefind, 2001) révèle que chaque sous-unité CK2 β interagit avec les deux sous-unités catalytiques, tandis que les sous-unités CK2 α n'ont aucun contact entre elles (*figure 23*).

Kinase atypique, CK2 est capable d'utiliser aussi bien l'ATP que le GTP comme donneur de phosphate et phosphoryle plus de 300 substrats *in vitro*. La plupart d'entre eux ont été confirmés *in vivo* (Meggio, 2003). L'étude des sites phosphorylés par CK2 montre une haute conservation du caractère acide, en particulier en position n+3, inhabituel (Meggio, 2003). La séquence type est Ser/Thr-x-x-Glu/Asp/pSer.

CK2 est décrite comme une kinase indépendante des messagers secondaires car son activité ne dépend pas des petites molécules typiquement impliquées dans l'activation des kinases : nucléotides cycliques (AMPc), lipides (IP₃) ou calcium (Litchfield, 2003). Néanmoins, *in vitro*, l'enzyme est inhibée par l'héparine (Tuazon, 1991) et activée par les polyamines (Leroy, 1997). La structure cristallographique de la sous-unité catalytique CK2 α (Niefind, 1998) rend compte du fait que l'activité de l'enzyme soit constitutive : elle révèle l'existence d'une forte interaction du N-ter avec la boucle d'activation, ce qui empêche cette dernière d'occuper le site catalytique. La formation de l'holoenzyme $\alpha_2\beta_2$ permet de moduler l'activité catalytique selon le substrat : le dimère de CK2 β module la spécificité des sous-unités catalytiques CK2 α vis-à-vis des substrats (Buchou, 2003a). Il existe ainsi trois classes de substrats : les substrats dits « CK2 β -dépendants », pour lesquels la sous-unité régulatrice stimule fortement l'activité catalytique (P53, CDC25B, Topoisomérase II) ; les substrats dont la phosphorylation est parfaitement inhibée par la présence de CK2 β (Calmoduline, S100b) ; les substrats phosphorylés aussi bien par la sous-unité catalytique seule que par l'holoenzyme (Hsp90). CK2 β apparaît également comme responsable du recrutement de certains substrats comme la Topoisomérase II (Bojanowski, 1993) ou p53 (Filhol, 1992). Enfin, la protéine CK2 β est capable de moduler *in vitro* l'activité catalytique d'autres sérine-thréonine kinases telles que c-Mos ou A-raf (Litchfield, 2003).

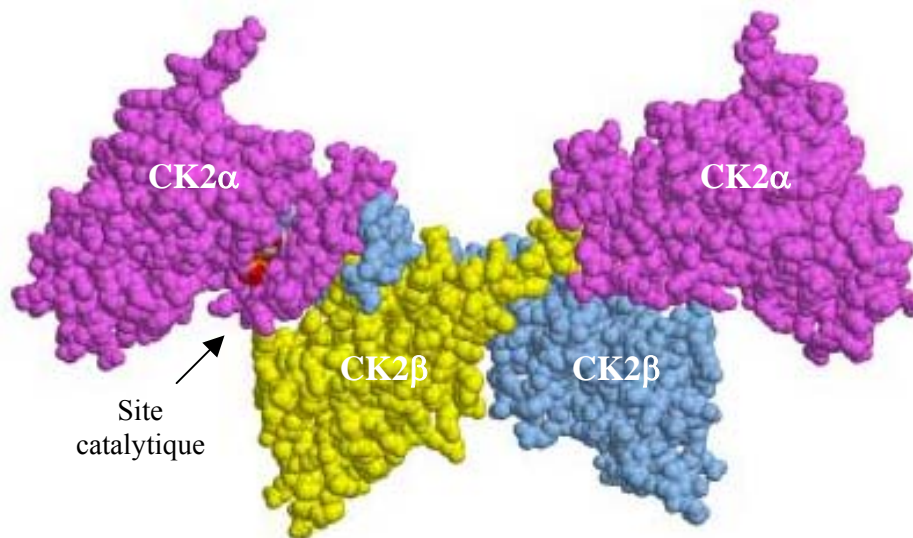


Figure 23 : Structure tridimensionnelle de l'holoenzyme tétramérique $\alpha_2\beta_2$. (RSCB, *Protein Data Bank*, 1JWH, Niefind & al)

L'holoenzyme a la forme d'un papillon dans lequel le dimère de CK2 β sert de plate-forme d'assemblage reliant les deux sous-unités catalytiques CK2 α qui n'ont aucun contact entre elles.

Une molécule d'ATP est présente dans l'un des sites catalytiques.

Les substrats de la CK2 sont de nature très diverse et impliquent l'enzyme dans de nombreux processus cellulaires (Litchfield, 2003 ; Meggio, 2003) comme la transduction du signal, le contrôle de l'expression génomique, le cycle cellulaire, la prolifération, le développement. Dans les cellules en prolifération, CK2 est majoritairement nucléaire (Krek, 1992 ; Martel, 2001). Elle joue un rôle clef dans la régulation du cycle cellulaire : l'utilisation d'oligonucléotides antisens ou d'anticorps dirigés contre l'une ou l'autre des sous-unités provoque un arrêt du cycle (Lorenz, 1993, 1994 ; Pepperkok, 1994 ; Toczyski, 1997). La matrice nucléaire est un environnement clé pour la signalisation de la protéine kinase CK2 dans le noyau (Guo, 2001). L'arrêt du cycle cellulaire aux points de transition G0/G1 ou G2/M résulte en une réduction de l'activité CK2 associée à la matrice nucléaire, et ce phénomène est réversible (Wang, 2003). Il existe donc des modulations de CK2 au sein de la matrice nucléaire pendant la progression du cycle. L'activité de l'enzyme reste cependant identique dans les extraits cellulaires totaux et des changements de localisation sont observés (Wang, 2003).

En raison de la multitude de ses substrats protéiques, il est concevable que la protéine kinase CK2 soit responsable d'une grande fraction du phosphoprotéome (Pinna, 2002). En interagissant avec plusieurs voies de signalisation, elle représente le prototype d'une protéine kinase multifonctionnelle (Litchfield, 2003 ; Meggio, 2003). Cette enzyme joue en effet un rôle central dans la cellule en agissant transversalement, contrôlant ainsi de nombreuses voies de signalisation. Son rôle dans le contrôle de la prolifération des cellules et dans l'inhibition de plusieurs protéines participant au déclenchement de l'apoptose (Ahmed, 2002 ; Buchou, 2003a) peut expliquer que la protéine kinase CK2, dont l'activité enzymatique est considérablement augmentée dans les cancers (Guerra & Issinger, 1999 ; Litchfield, 2003), soit impliquée dans des processus de tumorigenèse. Au contraire, son activité diminuerait lors de la sénescence cellulaire, et plus généralement lors du vieillissement de l'organisme (Ryu, 2006).

L'enzyme est également impliquée dans d'autres processus pathologiques. De nombreux agents infectieux, comme les parasites et les virus, ont « adopté » la CK2 afin de modifier post-traductionnellement certaines protéines essentielles à leur cycle (Guerra & Issinger, 1999 ; Meggio, 2003). La sous-unité catalytique est sur-exprimée en cas de glomérulonéphrite ; son inhibition pharmacologique ou la diminution de son niveau d'expression par des oligonucléotides antisens ralentissent la progression de la maladie dans des modèles animaux (Yamada, 2005). La protéine kinase CK2 a également été reliée à la mucoviscidose. La maladie est due à une mutation de la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) dont la mutation la plus courante est la délétion de la Phe508. Or, cette mutation abolit l'interaction entre CFTR et la sous-unité CK2 α (Treharne,

2007). La phosphorylation de CFTR par CK2 semble critique pour l'activité normale du canal d'ions chlorure (Treharne, 2007), ce qui apporte un nouvel éclairage sur la maladie et ouvre de nouvelles voies de recherche.

Récemment, un rôle prépondérant de CK2 est apparu par l'intermédiaire de l'un de ses substrats, Cdc37 (Miyata & Nishida, 2004). Cdc37 est une co-chaperonne de Hsp90 qui interagit avec de nombreuses kinases (v-Src, Akt, Raf...) et recrute Hsp90 ; elle est essentielle à leur stabilité et à leur intégrité fonctionnelle (MacLean & Picard D, 2003). La phosphorylation de Cdc37 par CK2 est indispensable à sa fonction de co-chaperonne (Miyata & Nishida, 2004). L'augmentation de l'activité CK2 dans les tumeurs pourrait indirectement être responsable de l'activité oncogène des protéines kinases concernées, en déséquilibrant la balance entre leur synthèse et leur dégradation.

La protéine kinase CK2 est également essentielle à la survie cellulaire : l'abolition des gènes codant pour la sous-unité catalytique est létale chez la levure *S.cerevisiae* (Padmanabha, 1990) tandis que la présence de la sous-unité régulatrice CK2 β n'est pas indispensable (Roussou & Draetta, 1994 ; Bidwai, 1995 ; Reed, 1995). Chez les mammifères, l'invalidation du gène codant pour la sous-unité CK2 α' génère des animaux viables (redondance de fonction de CK2 α et CK2 α'), mais les mâles sont stériles car seule la sous-unité CK2 α' est exprimée lors des derniers stades de la spermatogenèse (Xu, 1999).

L'invalidation du gène codant pour CK2 β est létal chez la Drosophile (Jauch, 2002) et est délétère dès les stades précoces du développement embryonnaire chez la souris (Buchou, 2003b). L'utilisation d'un système d'invalidation conditionnelle (système Cre-Lox) a montré que la protéine est essentielle à la viabilité des cellules souches embryonnaires (ES) murines. Ces résultats ont mis à jour le rôle essentiel de la protéine CK2 β dans la viabilité cellulaire des eucaryotes supérieurs et apportent un éclairage nouveau sur l'importance fonctionnelle du rôle régulateur des sous-unités CK2 β . L'absence de CK2 β perturbe probablement non seulement la régulation de l'activité catalytique de CK2, mais aussi celle d'autres protéines kinases. De plus, l'association de l'holoenzyme CK2 à la membrane plasmique est médiée par un domaine acide de la protéine CK2 β (Leroy, 1999). Par conséquent, la perte de CK2 β doit également perturber la localisation subcellulaire de l'enzyme, interdisant certaines fonctions spécifiques.

La régulation de l'holoenzyme demeure obscure. Des événements de phosphorylation par certaines tyrosines kinases moduleraient son activité catalytique : la phosphorylation de CK2 α par Lyn et c-Fgr, deux membres de la famille Src, conduit à une augmentation de son activité enzymatique (Donella-Deana, 2003), alors que la phosphorylation par la kinase Abl

conduirait à l'inhibition de cette activité (Herriche & Chambaz, 1998). Il est également possible que l'activité de l'enzyme soit modulée par son interaction avec des partenaires protéiques (Allende & Allende, 1998 ; Olsten & Litchfield, 2004 ; Olsten, 2005). Ainsi, l'interaction de CK2 α avec la protéine Prion conduit à l'augmentation de l'activité de la sous-unité catalytique seule. L'activité de l'holoenzyme est également modifiée : l'inhibition de la phosphorylation de certains substrats par la sous-unité CK2 β est levée, sans toutefois qu'il y ait un effet potentialisant vis-à-vis des substrats β -dépendants (Meggio, 2000). Autre exemple, celui de l'interaction de CK2 α avec Pin1, une peptidyl-propyl isomérase. Cette interaction inhibe spécifiquement la phosphorylation de la topoisomérase II lors de la mitose (Messenger, 2002).

Récemment, de nouvelles données sont apparues. Les inositol-phosphates, notamment IP₄ et IP₆, sont capables d'augmenter l'activité de l'holoenzyme purifiée à partir de foie, alors que cette modulation n'est pas possible avec l'enzyme recombinante (Solyakov, 2004). L'holoenzyme est en effet co-purifiée avec un inhibiteur qui n'est ni une phosphatase, ni une petite molécule, mais dont la nature reste inconnue, et les inositol-phosphates lèvent cette inhibition. D'autre part, l'activité CK2, essentielle à la structuration des vésicules d'endocytose à clathrine, est inhibée par les phosphatidyl-inositol-phosphates dans les vésicules formées (Korolchuk, 2005). Ceci représente de premiers éléments d'une régulation de la protéine kinase CK2 par des seconds messagers.

D'autre part, l'utilisation de techniques d'imagerie en temps réel a apporté une vision dynamique de l'holoenzyme. Alors que le complexe purifié *in vitro* est parfaitement stable, la situation *in vivo* révèle un tétramère dont chaque sous-unité possède une mobilité et une localisation particulière : l'association des 2 types de sous-unité est un phénomène extrêmement dynamique. Le contrôle de la localisation intracellulaire des deux types de sous-unité est réalisé indépendamment l'un de l'autre (Filhol, 2003 ; Theis-Febvre, 2005). Ceci est en accord avec la structure cristallographique du tétramère (Niefind, 2001) qui révèle que l'interface entre les sous unités catalytiques et régulatrices est constituée de deux zones de contacts extrêmement réduites par rapport à la surface de l'holoenzyme (*figure 24a*), permettant une flexibilité des contacts. Chacune des sous-unités peut former des complexes moléculaires indépendamment l'une de l'autre, le tétramère également, ce qui représente un mécanisme potentiel de régulation de cette kinase (Filhol, 2004b) (*figure 24b*).

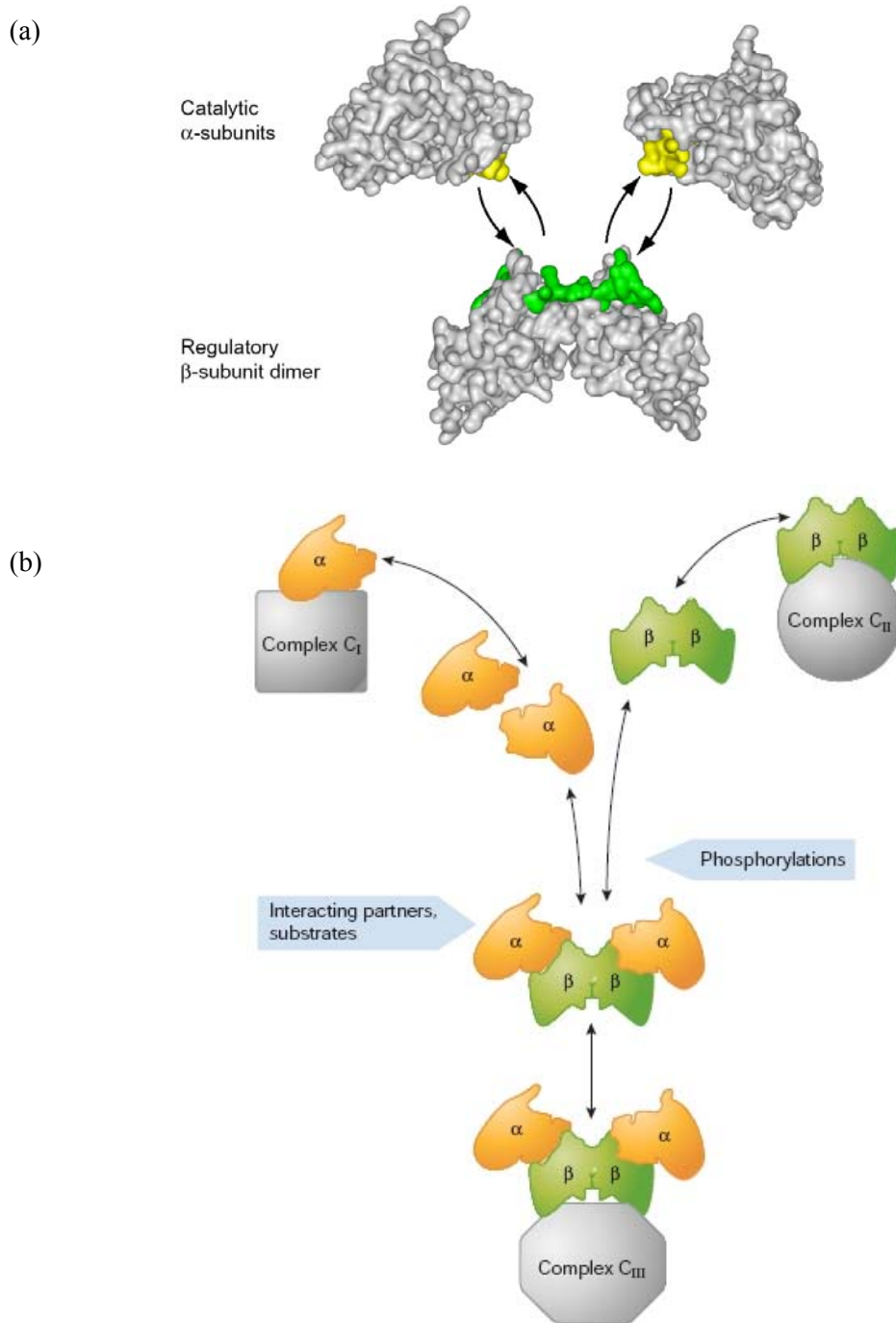


Figure 24 : Dynamique de l'holoenzyme. (Filhol, 2004b)

(a) L'interface entre les sous unités catalytiques et régulatrices est constituée de deux zones de contacts (colorées en jaune sur CK2 α et en vert sur CK2 β) extrêmement réduites par rapport à la surface de l'holoenzyme. La surface de contact est en effet de 832Å, ce qui suggère que le tétramère est un complexe transitoire *in vivo*. Cette flexibilité se traduit effectivement par une dynamique cellulaire différente des deux types de sous-unités (Filhol, 2003 ; Theis-Febvre, 2005).

(b) Dans les cellules, différentes populations de CK2 coexistent. Selon la concentration locale en partenaires et/ou substrats, le tétramère peut être engagé dans divers complexes macromoléculaires ou les sous-unités peuvent être recrutées indépendamment l'une de l'autre via un contrôle de la dynamique d'association/dissociation de l'holoenzyme.

II.2/ CK2 et cancer.

La modification post-traductionnelle de type phosphorylation, catalysée par les protéines kinases, est considérée comme le principal mécanisme de contrôle de la prolifération et de la différenciation (Hunter, 1992). L'activité enzymatique de la protéine kinase CK2 est considérablement augmentée dans les cancers et corrobore avec le grade de la tumeur (Guerra & Issinger, 1999 ; Litchfield, 2003) ; cette augmentation correspond à une surexpression des deux sous-unités. Le fait que la sous-unité régulatrice CK2 β soit conjointement surexprimée dans les tumeurs implique l'holoenzyme dans le processus cancéreux et donc l'activité modulatrice de CK2 β .

Le potentiel oncogénique de CK2 a été établi par transgénèse additionnelle de CK2 α chez la souris dans les lymphocytes (Seldin, 1995) et les cellules épithéliales de la glande mammaire (Landesman-Bollag, 2001a ; 2001b). Cette surexpression ciblée modérée prédispose au développement respectivement de lymphomes et de tumeurs mammaires. Le développement tardif des tumeurs suggère que la transformation cellulaire et la néoplasie nécessitent la mutation d'un ou de plusieurs autres oncogènes et/ou gènes suppresseurs de tumeurs. La double expression transgénique de CK2 α et c-Myc potentialise l'effet oncogénique des deux protéines (Channavajhala, 2002), tandis que l'expression transgénique de CK2 α chez des souris hétérozygotes ou nullizygotés pour l'expression de P53 résulte en une augmentation du pouvoir oncogénique de CK2 α (Landesman-Bollag, 1998). L'activité CK2 serait donc requise pour favoriser la croissance tumorale, mais la transformation cellulaire requiert la participation d'autres événements oncogéniques.

Un concept plus récent implique la protéine kinase CK2 dans la protection des cellules tumorales envers l'apoptose (Guo, 2001 ; Ahmed, 2002). CK2 interagit en effet avec plusieurs acteurs de la voie de signalisation impliquant la famille Wnt, voie réactivée dans de nombreux cancers et responsable de l'augmentation de la survie cellulaire par blocage de l'apoptose (**figure 25b**). CK2 forme un complexe moléculaire avec *Dishvelled* et la β -Caténine. La phosphorylation de la β -Caténine par CK2 au sein de ce complexe induit sa stabilisation (Song, 2000 ; 2003), ce qui permet une translocation dans le noyau de la β -Caténine, où elle joue le rôle d'activateur des facteurs de transcription TCF-LEF-1 qui régulent l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire. CK2 est également impliquée dans la voie de signalisation faisant intervenir le facteur de transcription NF κ B (Romieu-Mourez, 2001 ; 2002) (**figure 25a**). NF κ B régule l'activité de gènes contrôlant la prolifération, la survie et la transformation cellulaires. La protéine est captive dans le cytoplasme par association avec la protéine

inhibitrice I κ B. CK2 phosphoryle I κ B, induisant sa dégradation et donc la libération de NF κ B. Celui-ci, après translocation nucléaire, peut alors exercer son activité transcriptionnelle. CK2 phosphoryle aussi NF κ B, stimulant son activité transcriptionnelle. De ce fait, la surexpression de CK2 dans les cancers du sein conduit à une activation aberrante de la forme nucléaire de NF κ B (Romieu-Mourez, 2001 ; 2002). Les propriétés anti-apoptotiques de CK2 sont également dues au fait que la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bid par CK2 lui confère une résistance au clivage par la caspase 8 (Desagher, 2001) (*figure 25b*). C'est le fragment clivé généré (extrémité C-terminale) qui, après translocation vers la mitochondrie, induit la libération du cytochrome C par celle-ci, permettant l'activation en cascade de diverses caspases induisant l'apoptose. CK2 participerait donc au blocage massif de la machinerie apoptotique observée dans les cellules cancéreuses (Ahmed, 2002). D'autres protéines pro-apoptotiques possèdent un site de phosphorylation par CK2 proche du site de clivage par les caspases (Litchfield, 2003). CK2 pourrait donc avoir un rôle plus général dans la protection des cellules envers l'apoptose. L'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés contre la sous-unité CK2 α ou d'inhibiteurs pharmacologiques de l'activité CK2 restaure l'apoptose chimio-induite de cellules issues du cancer de la prostate (Slaton, 2004 ; Wang, 2005b) tandis que la surexpression transitoire de CK2 α dans des ces même cellules résulte en une augmentation significative de la résistance à l'apoptose induite par le récepteur de surface Fas (Desagher, 2001). D'autre part, l'inhibition de l'activité CK2 α sensibilise les cellules du cancer du colon à l'apoptose induite par TNF α (Wang, 2006).

Enfin, la protéine kinase CK2 jouerait un rôle clé dans les cellules cancéreuses ayant acquis le phénotype de multi-résistance aux chimiothérapies (MDR, *Multi Drug Resistance*) (Di Maira, 2007). La comparaison du degré d'expression de la sous-unité catalytique entre deux lignées de lymphoblastes humains, l'une sensible, l'autre multi-résistante, montre un niveau plus élevé de CK2 α dans la lignée MDR. Ceci résulte en une phosphorylation plus importante des substrats de la kinase. Son inhibition pharmacologique, ou la diminution du niveau de protéine CK2 α par siRNA, rétablit la chimio-sensibilité des cellules cancéreuses. Un résultat similaire est retrouvé sur une lignée MDR d'ostéosarcome humain (Di Maira, 2007).

Les éléments établissant une corrélation entre la protéine kinase CK2 et le processus tumorigénique s'accumulent (Filhol, 2002) : la sur-expression de l'holoenzyme dans les tumeurs reflèterait sa participation à la prolifération cellulaire (*figure 25c*) et à l'inhibition de l'apoptose (*figure 25b*) (Ahmed, 2002). La kinase est donc devenue une cible thérapeutique de choix (Unger, 2004 ; Ahmad, 2005). Dernièrement, la localisation nucléaire de CK2 α dans des cellules cancéreuses prostatiques a été associée rétrospectivement à un mauvais pronostic de

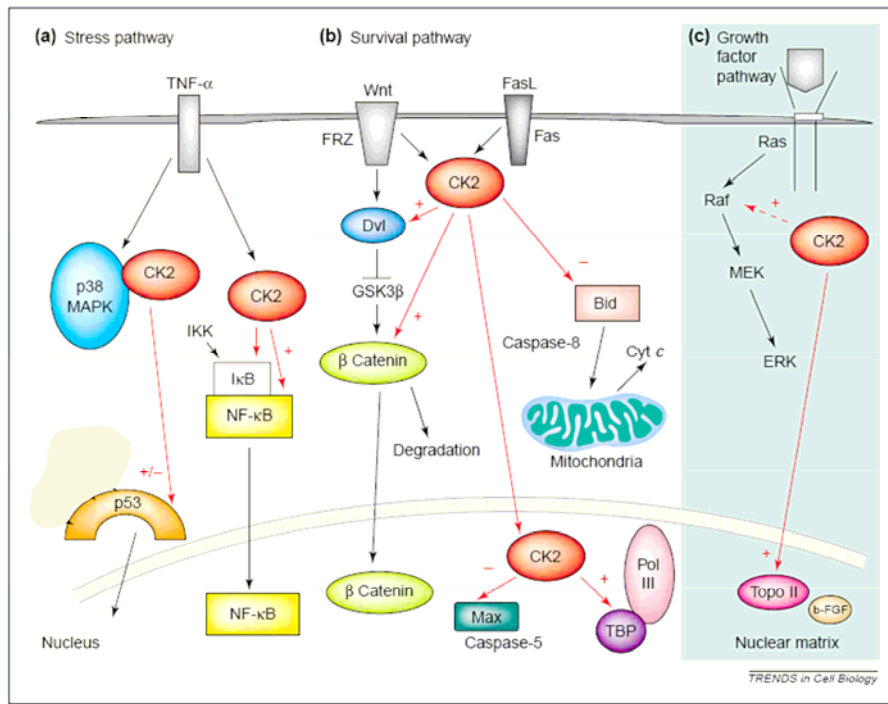


Figure 25 : Implications de la CK2 dans la survie cellulaire. (Ahmed, 2002)

Flèches : rapports enzyme-substrat ; l'effet de la phosphorylation sur la fonction des substrats est indiqué par les signes + et -.

(a) Conditions de stress (irradiation UV, stress thermique). Le stress engendre la formation du complexe p38 α -MAPK/CK2 qui permet la phosphorylation de p53 par CK2, induisant l'activité transcriptionnelle de p53. Le TNF- α (*Tumor necrosis factor α*) ou l'IL-1 (*Interleukin 1*) augmentent l'activité transcriptionnelle de NF- κ B via une phosphorylation par CK2 qui induit une translocation nucléaire du facteur NF- κ B. CK2 phosphoryle également la protéine inhibitrice I κ B, aboutissant à sa dégradation.

IKK, *I κ B kinase*.

(b) Survie cellulaire. Les protéines Dvl (*Dishevelled*) et β -caténine, appartenant à la voie de signalisation Wnt, sont phosphorylées par CK2, ce qui induit la stabilisation de la β -caténine et sa relocalisation nucléaire. Lors de dommages à l'ADN, CK2 agit comme un effecteur terminal et active la machinerie transcriptionnelle de l'ARN polymérase III (Pol III). Enfin, lorsque CK2 phosphoryle la protéine pro-apoptotique Bid (voie de signalisation apoptotique liée au récepteur Fas), le clivage de Bid par la caspase-8 est inhibé, empêchant le déclenchement de l'apoptose. De la même façon, la phosphorylation de Max bloque son clivage par la caspase-5.

Cyt c, *cytochrome c* ; FasL, *Fas ligand* ; FRZ, *Frizzled* ; GSK3 β , *glycogen synthase kinase 3 β* .

(c) Prolifération cellulaire. CK2 phosphoryle plusieurs protéines liées au cycle cellulaire telles que A-Raf et la Topoisomérase II, et s'associe avec le b-FGF (*basic fibroblast growth factor*). Dans les cellules en croissance, CK2 s'accumule dans le noyau et joue un rôle clef dans la progression du cycle cellulaire.

ERK, *extracellular-signal-regulated kinase* ; MEK, *MAP kinase kinase*.

la maladie et à une tendance pour ces cellules à participer au processus métastatique (Laramas, 2007). Ceci est un premier élément suggérant que CK2 puisse être utilisée à la fois comme marqueur et comme une cible thérapeutique. Une seconde étude montre que le niveau d'expression de CK2 α est une variable de mauvais pronostic chez les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë possédant un caryotype normal (Kim, 2007). Dans ce cas, l'utilisation d'un inhibiteur de CK2, l'apigénine, permet d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses surexprimant la sous-unité catalytique, tandis que les cellules normales de la moelle osseuse ne sont pas sensibles au traitement.

Bien que les aspects oncogénique (Seldin, 1995 ; Landesman-Bollag, 2001) et anti-apoptotique (Ahmed, 2002) de la sous-unité catalytique α soient établis, on ignore encore quel peut être le rôle de la sous-unité régulatrice β . D'autre part, la protéine CK2 β est tronquée de 2 acides aminés C-terminaux (mutant CK2 β Δ 2) dans de nombreuses cellules cancéreuses. Cette délétion est due à une protéolyse de la protéine CK2 β , et non à une mutation du gène (Filhol, *résultats non publiés*). Dans le cas où cette modification aurait un impact sur l'activité de la protéine CK2, la protéine pourrait être utilisée en étude diagnostic-pronostic. Si cette mutation n'est que la conséquence du processus tumoral, la forme CK2 β Δ 2 pourrait être utilisée comme marqueur. Des études cliniques semblables à celle réalisée à propos de CK2 α (Laramas, 2007) devront être menées pour éclaircir ce point.

II.3/ La sous-unité régulatrice CK2 β .

La protéine CK2 β ne présente aucune homologie de séquence avec une protéine connue (Allende & Allende, 1995). Chez les mammifères, un seul gène *CK2 β* a été identifié. Ce gène code pour une séquence de 215 acides aminés hautement conservée entre les espèces. Les deux isoformes chez *S. cerevisiae* présentent 40 à 45% d'homologie avec la séquence des mammifères (Bidwai, 1995; Reed, 1995) (**figure 26**). Les principales différences apparaissent au niveau des domaines caractérisés comme fondamentaux pour la fonction de CK2 β (voir II.3.a) : le domaine d'interaction avec CK2 α (résidus 181 à 203 chez la Souris), la boucle acide (résidus 55 à 64) ainsi que la région adjacente (résidus 65 à 69 chez la Souris). Au niveau de cette boucle acide, la position des résidus acides n'est pas systématiquement conservée. D'autre part, la répartition des prolines est modifiée, ce qui suggère un repliement différent de ce domaine chez la levure.

II.3.a/ Structure de la sous-unité régulatrice CK2 β .

La structure cristallographique de CK2 β (Chantalat, 1999) (**figure 27a**), résolue à 1,7Å, révèle que la protéine dimérise via un motif de doigt à zinc. L'interface, particulièrement hydrophobe, est très réduite par rapport à la surface totale du dimère, présageant que la surface libre puisse être impliquée dans des interactions avec de nombreux partenaires. Pour chaque monomère, les résidus basiques se concentrent dans la partie C-ter, tandis que les résidus acides se distribuent largement du côté N-ter. Notamment, la gouttière acide (55-64) qui se trouve à chaque extrémité du dimère génère un potentiel électrostatique tel que la force de répulsion entre les deux sous-unités est importante. Ce véritable dipôle répulsif (**figure 27b**) ne peut exister seul *in vivo*. Il existe donc obligatoirement des partenaires pour le stabiliser. La structure cristallographique révèle également une forte densité de résidus hautement conservés au cours de l'évolution à la surface du dimère. Ces résidus forment notamment un sillon hélicoïdal qui s'enroule autour du dimère (**figure 27c**). Comme la plupart des sites d'interaction de CK2 β avec ses différents partenaires ne sont pas connus, cette exposition au solvant de résidus conservés pourrait refléter leur engagement dans la liaison de partenaires ou de substrats de la CK2 dépendants de CK2 β .

Ces différentes observations suggèrent que le dimère de CK2 β est une plate-forme d'interaction qui permettrait l'interaction de l'holoenzyme avec certains substrats et son ciblage dans la cellule à travers certains partenaires. Le dimère représente également un module permettant la création de multicomplexes protéiques (Litchfield, 2003).



Figure 26 : Comparaison des séquences de la protéine CK2β au cours de l'évolution.

(Roussou & Draetta, 1994)

Les séquences alignées sont celle de Poulet (Ggck2b), de Souris (Mmck2b), de l'Homme (Hsck2b), des Bovins (Btck2b), de Drosophile (Dmck2b), de *C. elegans* (Ceck2b) et de *S. pombe* (Spck2b) ; la position des acides aminés sont celles des mammifères. Les 4 cystéines du doigt de zinc sont encadrées en turquoise tandis que la zone d'interaction majeure avec CK2α est surlignée en magenta. Les domaines et résidus importants décrits ci-dessous (voir figure 23) sont encadrés et leur position précisée.

Page suivante :

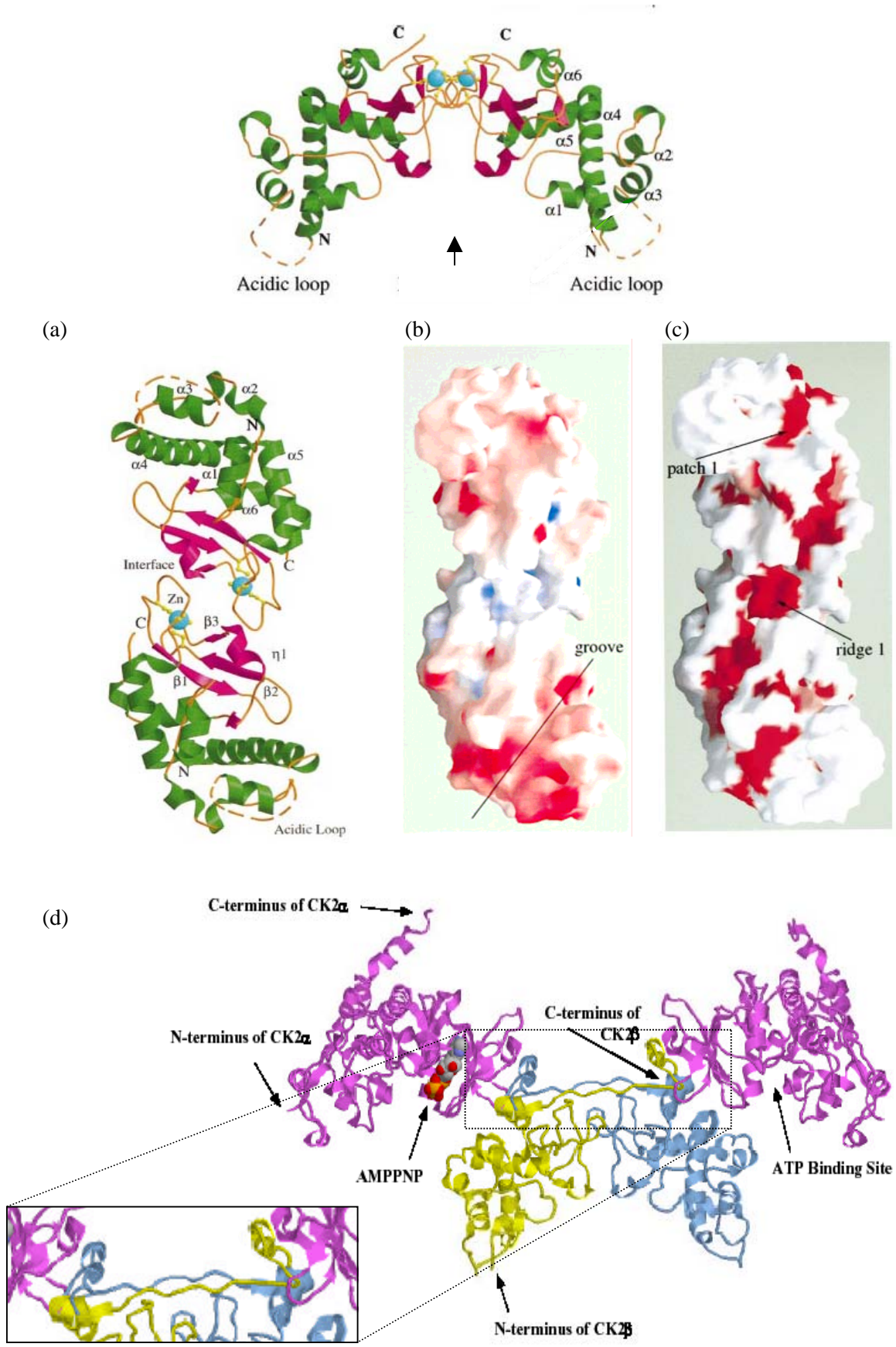
Figure 27 : Structure cristallographique du dimère de CK2 β et de l'holoenzyme CK2 $\alpha_2\beta_2$. (Chantalat, 1999 ; Niefind, 2001)

(a) Les hélices α sont représentées en vert, hormis une qui, avec les feuillets β , est engagée dans l'interface (en rose) ; le domaine acide 55-64 est en pointillé ; les atomes de zinc sont imagés par des sphères bleues ; les chaînes latérales des quatre cystéines liant le zinc sont en jaune. La vue du haut est selon le même axe que le tétramère en (d), tandis que la vue du bas représente le dimère selon un axe à 90° (flèche). Cette visualisation est reprise en (b) et (c). La structure cristallographique du dimère ne contient pas l'extrémité C-ter (182-215) qui est flexible et ne se structure qu'au contact des sous-unités catalytiques (d).

(b) Surface du dimère colorée selon le potentiel électrostatique, les charges positives (résidus basiques) en bleues et les charges négatives (résidus acides) en rouge. Pour chaque monomère, le domaine acide (55-64) forme une gouttière (« *groove* ») à chaque extrémité du dimère et génère un dipôle répulsif.

(c) Surface du dimère montrant les acides aminés hautement conservés au cours de l'évolution et exposés au solvant (en rouge). Ces résidus forment différents domaines (« *patch* ») ainsi qu'un sillon hélicoïdal qui s'enroule autour du dimère (« *ridge* »), suggérant leur engagement dans des interactions diverses.

(d) Tétramère $\alpha_2\beta_2$. Le corps de la protéine (1-150) est incapable de lier CK2 α ; cette partie N-terminale de la protéine est constituée d'hélices α et du doigt à zinc qui est le domaine de dimérisation. L'extrême partie C-terminale (182-215) n'est pas structurée et est sensible aux protéases, d'où son absence dans les cristaux de CK2 β (a). Au contact de CK2 α , ce domaine flexible se structure et représente le site d'interaction majeur avec sous-unité catalytique. Chaque sous-unité catalytique est en contact avec les résidus 150-181 de la sous-unité CK2 β proximale et l'extrémité C-ter (182-215) de la CK2 β distale (agrandissement).



Dans le tétramère, la région 182-215 du C-ter est le domaine d'interaction majeur avec CK2 α . L'engagement direct de cette région dans les interactions avec CK2 α a été confirmé par la structure cristallographique du tétramère résolue à 3,1Å (Niefind, 2001), dans laquelle les contacts de CK2 α avec CK2 β ont été identifiés sur la séquence 186-198. La structure cristallographique révèle que l'holoenzyme a la forme d'un papillon (*figure 27d*) dans laquelle le dimère de CK2 β sert de plate-forme d'assemblage reliant les deux sous-unités CK2 α qui n'ont aucun contact entre elles. Chaque sous-unité catalytique est en contact avec le corps (résidus 150-182) de la sous-unité CK2 β proximale et l'extrémité C-ter (182-215) de la CK2 β distale, l'interface entre les sous-unités CK2 α et le dimère CK2 β_2 étant faible par rapport à la surface de l'enzyme (*figures 24a et 27d*).

La protéine CK2 β présente certaines caractéristiques qu'il convient de décrire (*figure 28*) :

➤ La phosphorylation des résidus sérine 2 et 3, et probablement 4, par la sous-unité catalytique (Litchfield, 1991) serait un signal de stabilisation de CK2 β : quand les sérines sont mutées en acides glutamiques (phosphomimétisme) la stabilité de CK2 β augmente (Zhang, 2002). Néanmoins, ces sites ne sont pas primordiaux pour générer une holoenzyme fonctionnelle (Meggio, 1993). La fonction d'autophosphorylation *in vivo* de la CK2 n'est à ce jour pas encore éclaircie. Chez la Drosophile, l'importance de CK2 β vis-à-vis la viabilité a été démontrée (Jauch, 2002) et des expériences de restauration utilisant divers mutants de CK2 β ont été réalisées. Celles-ci montrent l'importance des sites d'autophosphorylation dans le maintien de la viabilité. Enfin, cette autophosphorylation ne peut pas être expliquée d'un point de vue structural : la structure cristallographique du tétramère pose problème car le N-ter des sous-unités β est à plus de 40Å du site catalytique de chaque sous-unité α (*figure 27d*).

➤ In vitro, les polyamines, composés basiques naturels, stimulent l'activité de l'holoenzyme en se liant à la sous-unité régulatrice au niveau de la boucle acide 55-64 (DLEPDEELED) (Leroy, 1997).

Ce domaine forme un sillon à la surface de la molécule (*figure 27b*) et est soupçonné d'être en réalité un domaine d'interaction et/ou de régulation, la liaison des polyamines *in vitro* reflétant l'interaction de ce domaine acide avec des domaines basiques de partenaires cellulaires éventuels. Les mutations neutralisant les charges négatives de ce segment acide (par exemple Glu60/61/63→Ala) abolissent la stimulation par les polyamines et augmentent le niveau basal de l'activité de l'holoenzyme d'un facteur 3 à 4 (Boldyreff, 1993 ; Leroy, 1997). Ceci suggère que le domaine acide (55-64) joue un rôle d'auto-inhibition sur l'activité enzymatique de la CK2 ; il est soupçonné interagir avec le domaine basique de CK2 α (74-80)

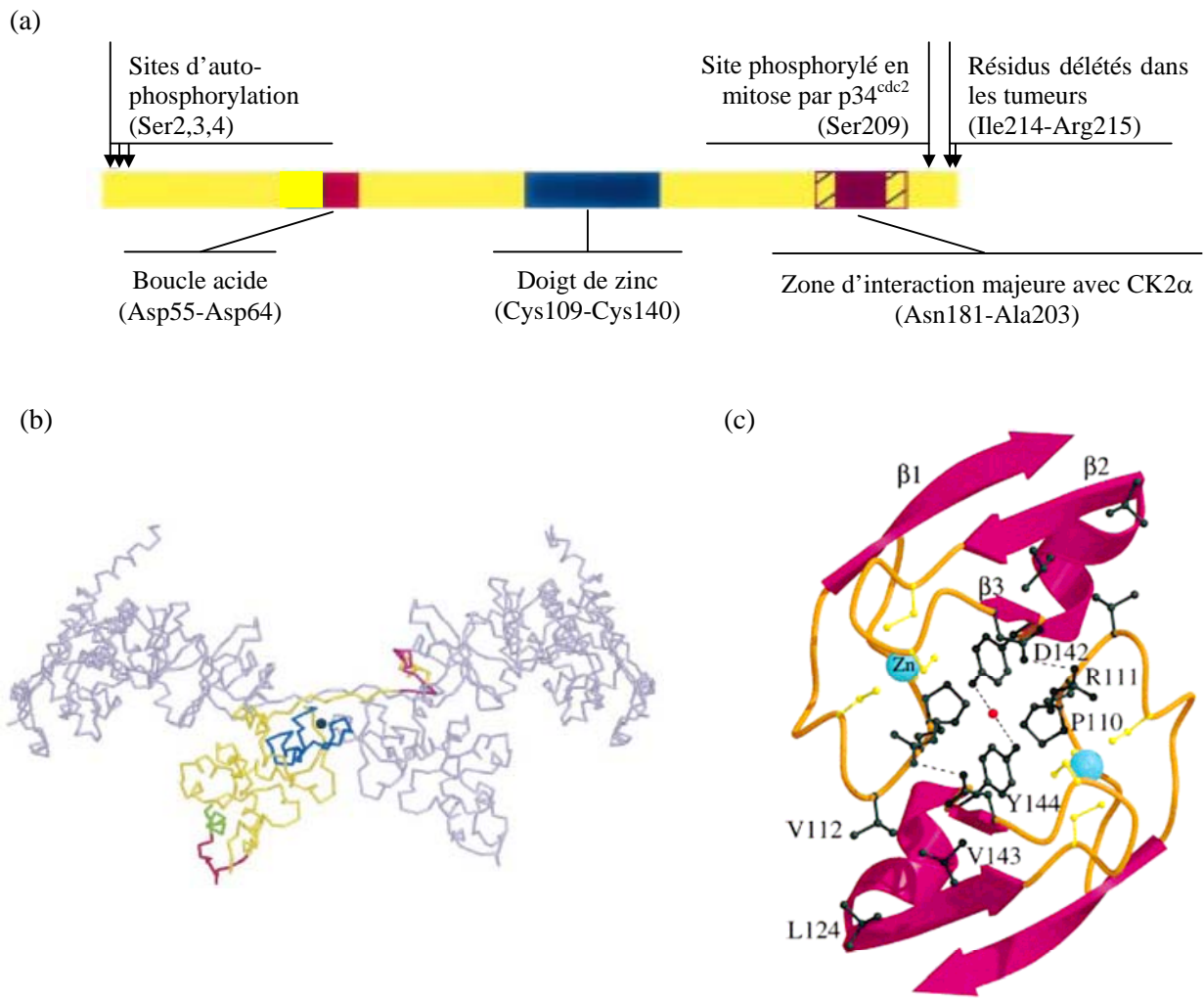


Figure 28 : Eléments remarquables de la protéine CK2 β . (Chantalat, 1999 ; Litchfield, 2003)

(a) Transposition linéaire d'une sous-unité CK2 β sur laquelle sont notées les principales caractéristiques de la protéine.

(b) Holoenzyme.

Le code des couleurs entre (a) et (b) est conservé afin de situer les domaines et résidus d'intérêt sur la protéine engagée dans l'holoenzyme. Voir texte pour les détails.

(c) Représentation de l'interface du dimère de CK2 β . Les atomes de zinc sont schématisés par des sphères bleues, les chaînes latérales des quatre cystéines impliquées dans la liaison du zinc sont représentées en jaune et celles des résidus essentiels à la structure du doigt à zinc en noir.

au sein du tétramère en mimant la configuration d'un substrat (Hinrichs, 1995) permettant ainsi une régulation intramoléculaire inhibitrice. Une fois de plus, ce modèle ne correspond pas à la structure cristallographique qui montre que les deux domaines sont localisés à plus de 30Å l'un de l'autre. *In vivo*, la surexpression de l'ornithine décarboxylase, enzyme limitant la biosynthèse des polyamines, accroît l'activité de la protéine kinase CK2 (Shore, 1997), mais ceci est réalisé après une augmentation du niveau d'expression des sous-unités CK2 α et CK2 β , et non par une interaction directe avec la sous-unité régulatrice (Lawson, 2006).

➤ Le doigt de zinc, responsable de la dimérisation des deux sous-unités CK2 β est constitué de quatre cystéines (109,114,137,140). La mutation des cystéines 109 et 114 qui détruit le doigt de zinc résulte en une agrégation des monomères et empêche la formation du tétramère (Graham & Litchfield, 2000 ; Canton, 2001). Ceci démontre que le dimère CK2 β ₂ représente un élément crucial pour l'assemblage de l'holoenzyme. Il est donc logique qu'un tel mutant ne puisse pas restaurer la viabilité des Drosophiles (Jauch, 2002).

L'interface entre les deux sous-unités régulatrices est hydrophobe et sa structure repose notamment sur la présence d'une proline en position 110 et d'une valine en position 143 (Chantalat, 1999) (*figure 28c*). Ces deux résidus ont été mutés individuellement en acide aspartique et des expériences de reconstitution *in vitro* de l'holoenzyme ont montré que les deux mutants sont capables d'homodimériser comme la protéine sauvage (Filhol, 2004a). Ces dimères mutants interagissent avec la sous-unité catalytique pour former un complexe tétramérique de taille moléculaire attendue. La mutation Pro110→Asp ou Val143→Asp déstabilise donc le doigt de zinc sans pour autant rompre la dimérisation de CK2 β , ce qui permet de générer une holoenzyme α ₂ β ₂. Cependant, la spécificité de substrats de l'holoenzyme ainsi reconstituée est très proche de celle observée pour la CK2 α isolée (Filhol, 2004a). Les deux mutants de CK2 β sont donc partiellement déficients vis à vis de la modulation de l'activité catalytique et ne sont donc plus fonctionnels pour transmettre complètement un élément de régulation aux sous-unités catalytiques. L'intégralité structurale de l'interface entre les deux sous-unités CK2 β est donc importante pour la régulation de l'holoenzyme CK2 α ₂ β ₂.

➤ Le domaine C-ter 150-215 contient des résidus hydrophobes très conservés essentiels à une interaction stable avec CK2 α . Le peptide 181-203, impliqué dans l'interaction α/β (Niefind, 2001) est responsable de la régulation positive de l'activité catalytique envers les substrats (Marin, 1997). *In vitro*, le mutant Tyr188/Phe190→Ala interagit avec CK2 α de façon plus labile que la protéine sauvage. Ceci résulte en une légère diminution de l'activité enzymatique par rapport au substrat β -dépendant Cdc25B. La triple mutation Met166/Tyr188/Phe190→Ala abolit complètement l'interaction CK2 β -CK2 α et de ce fait la

phosphorylation β -dépendante (Laudet, *soumis à publication*). Ceci laisse supposer qu'*in vivo*, la mutation, diminuant la stabilité des interactions, génère une protéine CK2 β mutante libre qui serait rapidement dégradée (Lüscher & Litchfield, 1994). Des effets phénotypiques dus à un déséquilibre des phosphorylations CK2 β -dépendantes sont donc attendus avec ce triple mutant.

Chez les mammifères, la sérine 209 est phosphorylée par p34^{cdc2} pendant la mitose (Litchfield, 1991, 1992), mais on ignore encore l'impact de cette modification. *In vitro*, la génération d'une holoenzyme fonctionnelle est indépendante de la présence de cette sérine (Meggio, 1993). Un mutant de délétion (Ile 214, Arg 215, noté CK2 β Δ 2), retrouvé dans de nombreuses cellules cancéreuses, ne subit plus cette modification (Filhol, *résultats non publiés*).

La structure cristallographique du tétramère pourrait n'être qu'un des aspects structuraux de l'enzyme. Les paradoxes entre données biochimiques et structure cristallographique pourraient être expliqués par une association supra-moléculaire de la CK2, mise en évidence *in vitro* (Valero, 1995). En conditions catalytiques optimales (150 μ M de peptide substrat RRREETEEE, 10 μ M d'ATP et 20mM de MgCl₂), l'enzyme s'associe en tétramères de tétramères ($\alpha_2\beta_2$)₄, formant des structures en anneaux (**figure 29a**). Le mécanisme d'autophosphorylation serait alors inter-moléculaire, et l'interaction entre la région acide de CK2 β (55-64) et la région basique de CK2 α pourrait exister entre tétramères (Litchfield, 2003). Cette hypothèse est confortée par le fait que diverses mutations en alanine de la région acide (Asp55/Glu57 \rightarrow Ala et Asp59/Glu60/61/63/Asp64 \rightarrow Ala) abolissent l'autophosphorylation de CK2 β (Boldyreff, 1994). Cette organisation quaternaire n'a néanmoins jamais pu être vérifiée *in vivo* mais récemment, un regain d'intérêt est apparu pour ce concept d'association supra-moléculaire, longtemps considéré comme un artéfact *in vitro*. Une étude approfondie des cristaux obtenus pour l'analyse structurale du tétramère révèle l'existence d'interactions ioniques entre les tétramères (Niefind & Issinger, 2006). Notamment, chaque sous-unité régulatrice d'un tétramère interagit avec une sous-unité semblable d'un autre tétramère via une interface qui représente plus du double de l'interface CK2 β -CK2 α au sein d'une holoenzyme. Ces interactions génèrent une structure supra-moléculaire trimérique qui forme un cercle (**figure 29b**).

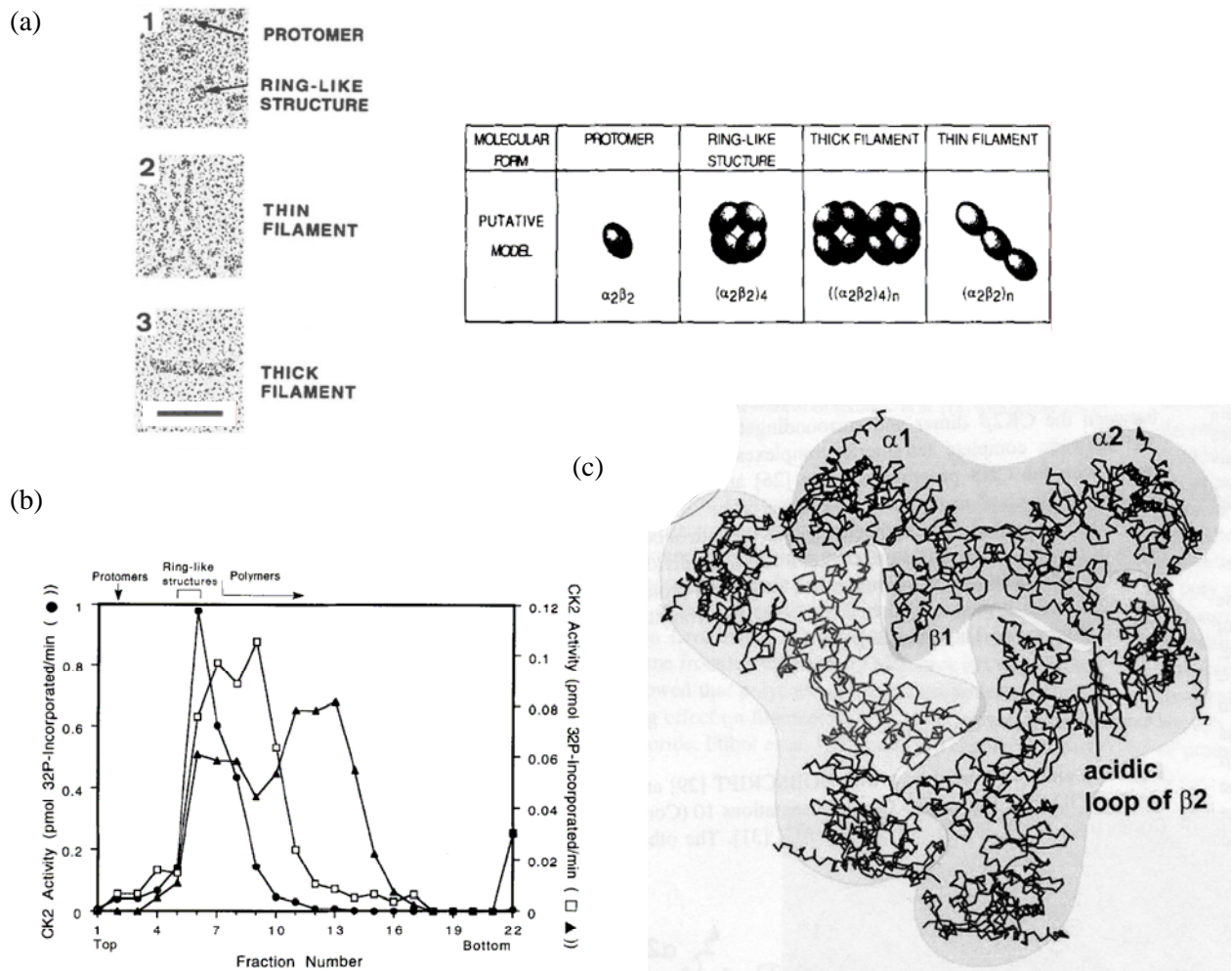


Figure 29 : Association supra-moléculaire de la CK2. (Valero, 1995 ; Niefind & Issinger, 2006)

(a) In vitro, l'enzyme s'associe en tétramères de tétramères $(\alpha_2\beta_2)_4$, formant des structures en anneaux caractérisées par microscopie électronique (la barre d'échelle correspond à 100nm).

(b) Vitesse de sédimentation en gradient sucrose (5-25%, w/v) de l'holoenzyme recombinant (1,5 μ g) selon les conditions catalytiques : 100mM NaCl, absence de substrat, d'ATP et du cofacteur Mg^{2+} (\blacktriangle) ; 30mM NaCl, 150 μ M de peptide substrat RRREEETEEE, 10 μ M d'ATP , 1mM (\square) ou 20mM (\bullet) de $MgCl_2$. L'activité CK2 est mesurée sur chaque fraction. Les fractions dans lesquelles sont visualisés les protomères (holoenzyme $\alpha_2\beta_2$), les structures en anneaux (tétramère de $\alpha_2\beta_2$) et les filaments de protomères ou d'anneaux (polymères) sont annotées.

(c) Dans les cristaux de l'holoenzyme, chaque sous-unité régulatrice d'un tétramère interagit avec une sous-unité régulatrice d'un autre tétramère. Ces interactions intermoléculaires génèrent une structure trimérique qui forme un cercle.

II.3.b/ Fonction de CK2 β indépendante de la sous-unité CK2 α .

La sous-unité CK2 β est importante pour la structure et la fonction de la CK2, mais elle pourrait également posséder des fonctions indépendantes. Des études de type "pulse-chase" métabolique indiquent que CK2 β est synthétisée en excès *in vivo* par rapport aux sous-unités α et α' et qu'une fraction dépourvue de CK2 α est soit rapidement dégradée (Lüscher & Litchfield, 1994), soit impliquée dans d'autres complexes moléculaires (Guerra & Issinger, 1999). D'autre part, des études de localisation cellulaire dynamique suggèrent des mobilités différentes pour les deux types de sous-unités (Filhol, 2003 ; Theis-Febvre, 2005). Enfin, CK2 β interagit avec CK2 α au niveau d'une séquence commune aux kinases, ce qui doit lui permettre d'interagir par l'intermédiaire du même domaine avec d'autres kinases et éventuellement de les moduler. En effet, par criblage en double hybride chez la levure, d'autres sérine-thréonine kinases partenaires de CK2 β ont été caractérisées (Kusk, 1999). CK2 β joue un rôle régulateur sur ces kinases : elle inhibe c-Mos (Chen, 1997 ; Chen & Cooper, 1997) et active A-Raf (Hageman, 1997). Elle interagit également avec p90rsk (Kusk, 1999), Lyn (Lehner, 2004) et les *checkpoint kinases* Chk1 (Guerra, 2003) et Chk2 (Bjorling-Poulsen, 2005). CK2 β n'aurait donc pas un rôle limité au contexte CK2 et participerait par elle-même à d'autres aspects de la régulation cellulaire. Lorsque la diversité des partenaires de CK2 β est analysée, les fonctions de la protéine indépendantes de CK2 sont à prendre en considération.

II.3.c/ Etude *in vivo* de la sous-unité CK2 β .

Chez la levure *S. cerevisiae*, l'invalidation des deux gènes *CK2B1* et *CK2B2* n'affecte pas le phénotype des cellules (Bidwai, 1995 ; Reed, 1995), ce qui suggère que l'activité constitutive de la sous-unité catalytique est suffisante pour la survie cellulaire. Chez *S. pombe*, l'invalidation du gène unique *CK2 β* génère un phénotype plus sévère mais non létal : des défauts dans la structure cellulaire et une sensibilité au froid ont été observés (Roussou & Draetta, 1994).

Chez les eucaryotes supérieurs, cette invalidation est plus drastique. Chez *C. elegans*, l'utilisation de RNAi dirigé contre la sous-unité régulatrice de CK2 engendre un phénotype partiel probablement dû à la présence résiduelle de la protéine : une létalité embryonnaire est observée dans moins de 80% des cas, mais une croissance post-embryonnaire réduite est décelée (Fraser, 2000). Ces résultats ont été confirmés par une étude génétique chez la *Drosophile* (Jauch, 2002) qui a également mis en évidence le rôle de CK2 β dans la

prolifération et/ou la survie cellulaire pendant le développement embryonnaire du système nerveux.

Chez la Drosophile, un mutant hypomorphe a été décrit (Akten, 2003). L'impact de cette mutation est un phénotype circadien lent (mutant 'Andante'), lié à la diminution de la quantité de protéine CK2 β . Ceci a pour conséquence une baisse de l'activité enzymatique CK2 dépendante de la sous-unité régulatrice, ciblée sur les substrats Timeless et Period. La protéine est ainsi impliquée dans le rythme circadien chez la Drosophile (Akten, 2003), mais également chez le champignon *Neurospora* (Yang, 2002 ; 2003) et dans le règne végétal, chez *Arabidopsis* (Sugano, 1998 ; 1999).

L'inactivation du gène *CK2 β* chez la souris provoque une létalité embryonnaire post-implantatoire (Buchou, 2003b) (**figure 30a**). Les embryons mutants montrent un retard de croissance à E6,5 sans signe d'apoptose. La détection des cellules embryonnaires en phase S du cycle de division, par injection ponctuelle de BrdU à la femelle gestante 1h avant son sacrifice, met en évidence une réduction de la prolifération cellulaire qui explique ce retard. *In vitro*, les morules CK2 β ^{-/-} mûrissent jusqu'au stade de blastocystes, mais les cellules souches embryonnaires ne développent pas de bouton embryonnaire (**figure 30b**). D'autre part, l'utilisation d'un système d'inactivation conditionnelle du gène *CK2 β* a montré que la protéine est essentielle à la viabilité des cellules souches embryonnaires (**figure 30c**). Ces observations suggèrent qu'au cours de l'évolution, la protéine CK2 β ait acquis des fonctions qui la rendraient indispensable pour la viabilité embryonnaire et la croissance cellulaire.

Les cellules souches embryonnaires murines hétérozygotes CK2 β ^{+/-} expriment un faible niveau de protéine CK2 β par rapport aux cellules sauvages (Buchou, 2003b). Ceci se traduit par une diminution de l'activité CK2 β -dépendante (Blond, 2005). Néanmoins, aucun phénotype par rapport à la prolifération des cellules, leur résistance au stress ou leur capacité à générer des tératocarcinomes n'a pu être démontrée (Blond, 2005). Chez les souris hétérozygotes adultes viables, qui ne montrent aucun phénotype, une compensation du taux d'expression de la protéine par rapport aux souris sauvages est observée (Buchou, 2003b). Néanmoins, une déformation du rapport mendélien est constaté à la naissance, avec un déficit d'environ 30% de nouveau-nés hétérozygotes (Blond, 2005). Ceci s'explique par la présence à mi-gestation d'embryons hétérozygotes mal formés qui présentent un retard de croissance, une malformation crânienne ou des défauts cardiaques) (**figure 30d**). Ces embryons hétérozygotes retardés ont compensé le niveau d'expression de CK2 β mais arborent une forme (probablement post-traductionnelle) différente de la protéine (Blond, 2005).

Page suivante :

Figure 30 : Phénotype nullizygotés et hétérozygotés liés au gène murin $CK2\beta$. (Buchou, 2003b ; Blond, 2005)

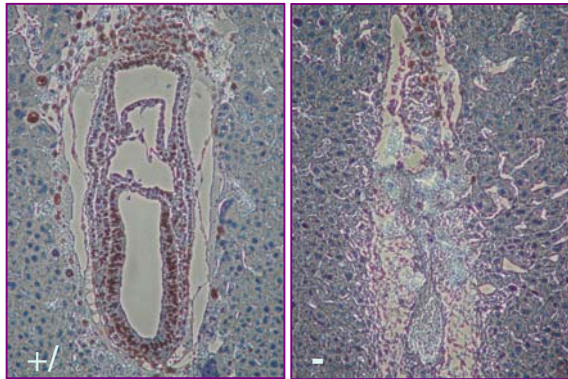
(a) L'inactivation du gène $CK2\beta$ chez la souris génère une létalité embryonnaire post-implantatoire : coloration à l'hématoxyline et marquage BrdU de coupes sagittales d'un embryon sauvage $CK2\beta^{+/+}$ et d'un embryon nullizygoté $CK2\beta^{-/-}$ à E7.5.

(b) *In vitro*, aucune différence n'est visible entre les morules (A) ou les blastocystes (B) sauvages et leurs équivalents nullizygotés (E et F respectivement). Après 4 (C) et 7 (D) jours de culture, les embryons sauvages développent un bouton embryonnaire (ICM : *internal cell mass*) au dessus d'une couche cellulaire formée par les trophoblastes (TG). La masse cellulaire interne des embryons mutants ne se développe pas (G et H).

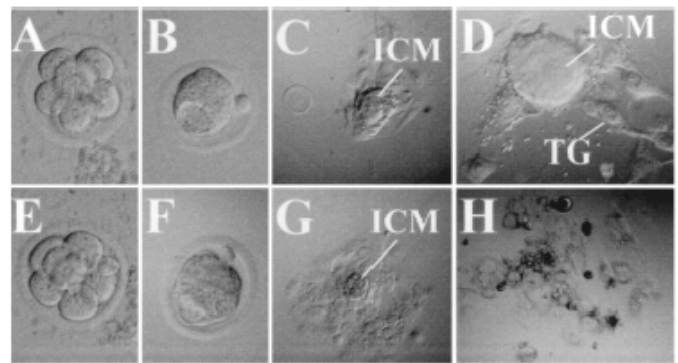
(c) Utilisation d'un système d'inactivation conditionnelle démontrant le caractère essentiel de la protéine $CK2\beta$ dans la viabilité des cellules souches embryonnaires murines. Les cellules de type sauvage, possédant un allèle sauvage et un allèle conditionnel (génotype $CK2\beta^{2lox/+}$), ainsi que les cellules hétérozygotés conditionnelles (génotype $CK2\beta^{2lox/-}$, un allèle conditionnel et un allèle nul) sont infectées par un rétrovirus exprimant la recombinaise du bactériophage P1 (Cre). Celle-ci permet l'excision de l'allèle conditionnel et la génération par conséquent d'un allèle nul. Après 4, 6 et 9 jours de culture en présence de puromycine, qui sélectionne les événements de recombinaison, les cellules sont colorées à la fuchsine basique et au bleu de méthylène. L'action de la recombinaise génère des cellules hétérozygotés $CK2\beta^{+/+}$ viables à partir de cellules $CK2\beta^{2lox/+}$, tandis que les cellules nullizygotés $CK2\beta^{-/-}$, obtenues à partir des cellules hétérozygotés conditionnelles $CK2\beta^{2lox/-}$, sont absentes.

(d) A mi-gestation (E10.5), les embryons mal formés se révèlent être des embryons hétérozygotés ($CK2\beta^{+/-}$). Sur chaque cliché, l'embryon de gauche, qui montre de sévères retards de croissance et/ou des anomalies de développement, est hétérozygoté, tandis que l'embryon de droite, de la même portée, est sauvage ($CK2\beta^{+/+}$). (Le génotypage est réalisé à partir de l'ADN génomique extrait des sacs vitellins correspondants.)

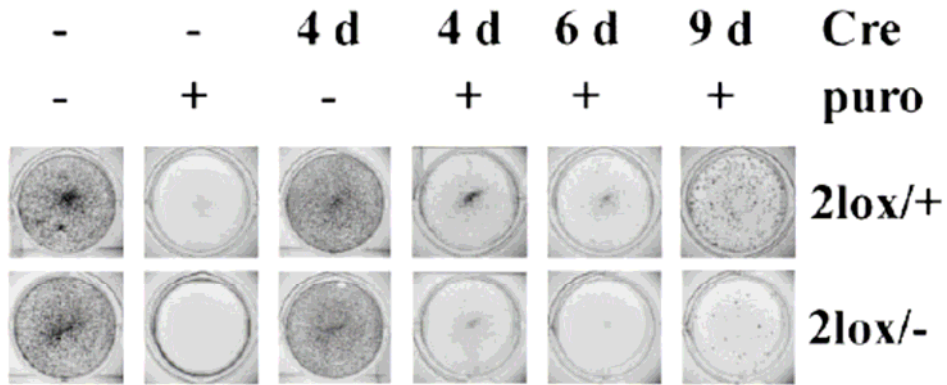
(a)



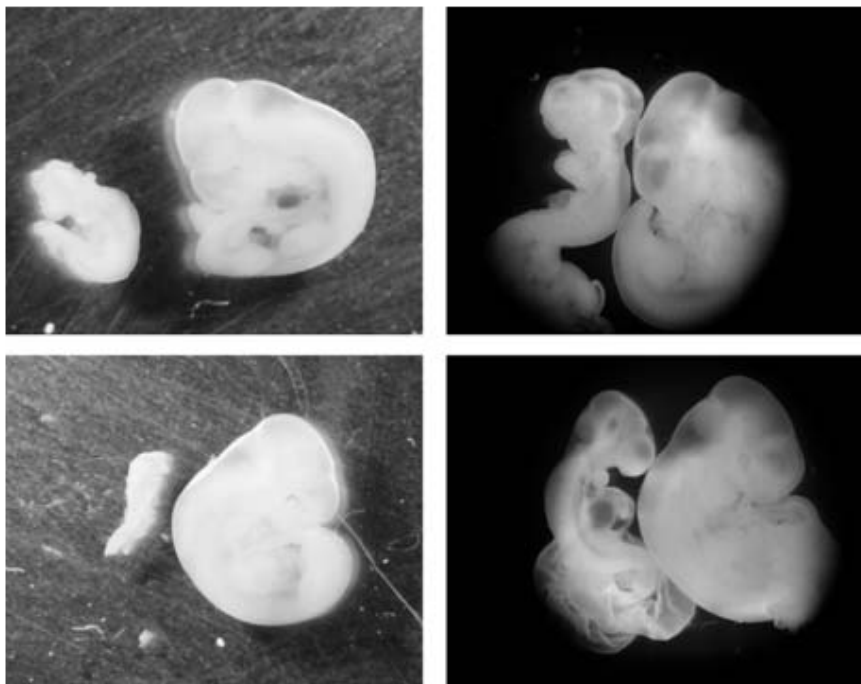
(b)



(c)



(d)



Jusqu'à peu, seuls les organismes comme la levure ont permis des études de fonctions de la protéine kinase CK2 (Glover, 1998). Dans les systèmes vivants plus complexes tels que les mammifères, l'étude de la protéine CK2 β est rendue difficile par le fait qu'elle soit synthétisée en excès par rapport à la sous-unité catalytique et que le temps de demie-vie de la fraction de CK2 β non-engagée dans l'holoenzyme est extrêmement courte (10') (Lüscher & Litchfield, 1994). Par contre, celui-ci est d'environ 18h pour la fraction engagée dans l'holoenzyme. L'utilisation des ARN interférents de type shRNA (*small hairpin RNA*) en expression stable n'élimine pas complètement l'expression de la protéine. Dans ces conditions, l'interaction CK2 α -CK2 β étant de l'ordre du nanomolaire (Martel, 2002), il reste probablement des niveaux d'expression des sous-unités suffisants pour assurer les fonctions de base de l'holoenzyme dans la cellule. Néanmoins, cette technique des shRNA en expression stable a montré l'implication de CK2 β dans la mitose, et notamment dans la formation des centrosomes (Bettencourt-Dias, 2004). Réciproquement, la sur-expression transitoire de CK2 β est sans effet cellulaire. De façon intéressante, la sur-expression stable de la protéine s'est révélée impossible, suggérant une régulation fine du niveau d'expression (Vilk, 2001 ; Litchfield 2003).

La protéine se révèle donc être essentielle chez les eucaryotes supérieurs, mais il n'y a que peu d'outils efficaces permettant d'appréhender ses fonctions *in vivo*.

PARTIE III :
Projet de recherche.

Afin de mieux comprendre les fonctions de la protéine CK2 β chez les mammifères, un test cellulaire qui permet d'aborder la fonction modulatrice de CK2 β a été validé au cours de ce travail. La stratégie employée utilise le système d'inactivation conditionnelle du gène *CK2 β* mis au point par le laboratoire (Buchou, 2003b). Dans le gène sauvage *CK2 β* , deux séquences LoxP ont été introduites. Elles entourent le promoteur, l'exon 1 non codant et l'exon 2 qui contient le site d'initiation de la traduction (allèle conditionnel 2lox). Les sites LoxP sont des séquences de 34 paires de bases qui peuvent être excisées deux à deux par la recombinaison du bactériophage P₁ (Cre). Après recombinaison, la délétion du promoteur, de l'exon 1 et de l'exon 2 génère un allèle nul (allèle -) (**figure 31**).

Le modèle cellulaire utilisé est celui des cellules souches embryonnaires (ES) murines hétérozygotes *CK2 β ^{2lox/-}*. Une infection rétrovirale (système pMSCV, Clontech) permet d'exprimer la recombinaison du bactériophage P1 et génère des cellules ES nullizygotiques *CK2 β ^{-/-}* qui ne survivent pas. L'inactivation du gène *CK2 β* endogène est en effet létale pour les cellules ES (Buchou, 2003b).

Au cours de ce travail, des expériences d'inactivation conditionnelle ont été réalisées à partir des cellules ES *CK2 β ^{2lox/-}* exprimant préalablement de façon stable une forme exogène (rétrovirale) étiquetée sauvage ou mutée de la protéine CK2 β . L'étiquette HA, correspondant à l'épitope de l'hémagglutinine du virus de la grippe, permet de distinguer la protéine exogène de la protéine endogène. Cette étiquette est placée en N-ter pour ne pas perturber la fonction de CK2 β . Ce système de « mort induite » permet de tester différents mutants pour leur capacité à restaurer la survie des cellules *CK2 β ^{-/-}*. Ces mutants ont été choisis selon la pertinence de précédentes études biochimiques (Boldyreff, 1993 ; Meggio, 1993 ; Lüscher & Litchfield, 1994 ; Leroy, 1997 ; Filhol, 2004a), de celles réalisées *in vivo* chez la Drosophile (Jauch, 2002 ; Akten, 2003) et à la lumière de la structure cristallographique de l'enzyme (Niefind, 2001). Ce système apparaît comme un outil unique pour étudier les fonctions de la protéine CK2 β dans les cellules de mammifères (**figure 32**).

Les expériences de restauration de la viabilité cellulaire sont la base du projet initial, qui consistait en une étude fonctionnelle de la sous-unité CK2 β dans les cellules souches embryonnaires de souris, notamment par rapport à la survie et la prolifération de ces cellules ainsi que leur différenciation en corps embryonnaires. Cependant, l'inactivation spatio-temporelle du gène *CK2 β* dans le système nerveux central chez la souris nous a apporté de nouveaux éléments de réflexions quant à l'implication de CK2 dans la biologie des cellules souches neurales. Le système nerveux central est en effet le tissu où CK2 β est le plus exprimé et, en

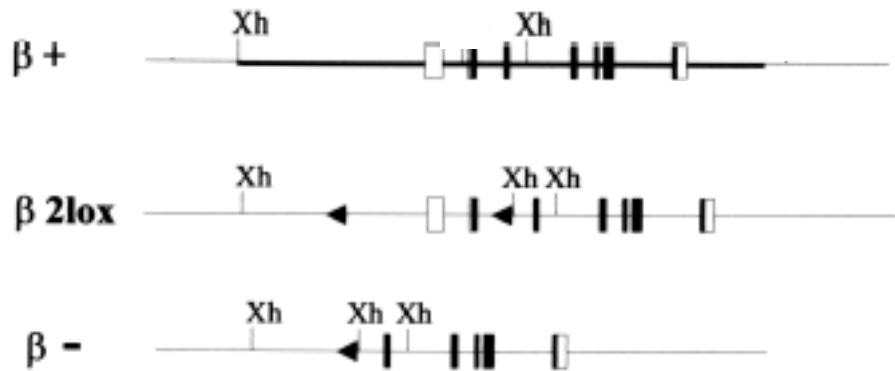


Figure 31 : Invalidation conditionnelle du gène *CK2β* (Buchou, 2003)

Représentation des allèles sauvage (+), conditionnel (2lox) et nul (-). Les rectangles schématisent les sept exons du gène, les noirs représentant l'ADN codant. Les sites LoxP sont indiqués par les triangles noirs. Les sites de restriction de l'enzyme XhoI (Xh) sont utilisés lors du génotypage des cellules par Southern Blot.

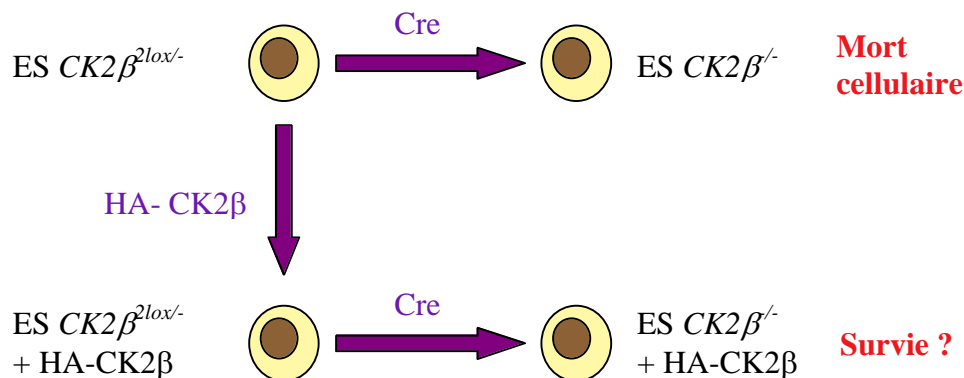


Figure 32 : Modèle cellulaire d'invalidation conditionnelle du gène *CK2β* et restauration de la viabilité par l'expression rétrovirale de la protéine étiquetée.

Les expériences réalisées utilisent des cellules souches embryonnaires (ES) hétérozygotes conditionnelles pour l'expression du gène *CK2β* (*CK2β^{2lox/-}*). L'infection rétrovirale permettant d'exprimer la recombinase (Cre) dans ces cellules génère des cellules ES nullizygotes (*CK2β^{-/-}*) qui ne survivent pas (Buchou, 2003).

Le test cellulaire mis en place consiste à effectuer une première infection rétrovirale permettant d'exprimer la protéine *CK2β* étiquetée HA (HA-*CK2β*) avant de procéder à l'invalidation conditionnelle. La survie potentielle des cellules nullizygotes, permet d'étudier l'implication de *CK2β* dans différents paramètres cellulaires et de définir des domaines fonctionnels pour la protéine.

particulier, où le rapport de l'expression des sous unités régulatrices par rapport aux sous-unités catalytiques est le plus élevé (Guerra, 1999 ; Xu, 1999). D'autre part, par mutagenèse induite et criblage phénotypique lié au système nerveux central chez la Drosophile, 2 souches correspondant à des mutations du gène CK2 β ont été isolées (Jauch, 2002 ; Akten, 2003).

Le développement d'un modèle d'inactivation génétique conditionnelle du gène chez la souris a en effet permis de cibler l'étude fonctionnelle de CK2 β dans les cellules souches neurales (*manuscrit en préparation*). Au cours du développement embryonnaire, CK2 β module la balance prolifération/auto-renouvellement/différenciation des cellules souches neurales. L'inactivation ciblée du gène CK2 β dans ces cellules résulte en une perte de leur capacité d'auto-renouvellement et de prolifération, mais également de leur capacité à générer des précurseurs d'oligodendrocytes, alors que l'astrocytogenèse et la neurogenèse ne sont pas affectées (*manuscrit en préparation*).

L'enjeu de la compréhension des processus moléculaires qui régissent le contrôle des voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie des cellules souches réside dans le fait que la dérégulation de ces processus intervient lors de la cancérogenèse (Reya, 2001 ; 2005 ; Pardal, 2003 ; Clarke, 2006).

Le projet scientifique concernant les cellules souches embryonnaires a donc été réorienté plus spécifiquement vers la différenciation neurale.

L'utilisation du système cellulaire de mort induite et restauration de la viabilité devrait permettre de définir les domaines de CK2 β fondamentaux pour sa fonction modulatrice. En effet, le système cellulaire mis en place permet de remplacer dans les cellules ES la protéine endogène par une protéine exogène mutée. En analysant le phénotype des lignées mutantes dont la restauration de la viabilité a été obtenue, et notamment au cours de leur différenciation, une cartographie moléculaire de la fonction modulatrice de CK2 β peut être envisagée.

.MATERIEL &
METHODES.

I/ Obtention des lignées cellulaires CK2 β^{\pm} exprimant une forme exogène HA-CK2 β sauvage ou mutée.

I.1/Construction des plasmides pMSCV HA-CK2 β /néo^R.

Les ADN complémentaires correspondant au gène aviaire CK2 β sauvage (wt) ou muté, flanqué en 5' d'une séquence codant pour l'étiquette HA (hémagglutinine du virus de l'influenza) et d'une séquence 'Kozak' (GCC GCC ACC) qui positionne les ribosomes sur le codon d'initiation de la traduction AUG de l'étiquette HA, sont obtenus par PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Pour les ADN complémentaires codant les protéines HA-CK2 β^{WT} , HA-CK2 $\beta^{\Delta 2}$, HA-CK2 $\beta^{\text{Ser2,3,4Ala}}$, la matrice de PCR est la construction pSG5 CK2 β^{WT} (O Filhol). Le système *Expand High Fidelity* (Roche) est utilisé dans les conditions préconisées par le fournisseur. Les amplicons possèdent également un site de restriction EcoRI en 5' et un site de restriction BglII en 3'. Les oligonucléotides suivants ont été synthétisés (l'étiquette HA est soulignée, les sites de restriction sont en italiques et les codons ATG et stop sont en gras) :

- Pour l'ADNc HA-CK2 β^{WT} , codant la forme sauvage de la protéine, la séquence de l'oligonucléotide 5' est 5'-CG *GAA TTC* GCC GCC ACC **ATG** TAT CCT TAT GAT GTT CCT GAT TAT GCT **ATG** AGC AGC TCC GAG GAG GTG-3', et celle de l'oligonucléotide 3' est 5'-GA AGA *TCT TCA* GCG GGA TGG TCT TCA CG-3'.

- Pour l'ADNc HA-CK2 $\beta^{\Delta 2}$, codant la forme tronquée des deux résidus C-terminaux (I²¹⁴, R²¹⁵) détectée dans les extraits tumoraux (Filhol O, *résultats non publiés*), la séquence de l'oligonucléotide 3' est 5'-AA *GGA TCC TCA* GGT CTT CAC GGG-3'.

- Pour le mutant HA-CK2 $\beta^{\text{Ser2,3,4Ala}}$, pour lequel les sites d'auto-phosphorylation sont abolis (Litchfield, 1991 ; Lin, 1994), la séquence de l'oligonucléotide 5' est 5'-CG *GAA TTC* GCC GCC ACC **ATG** TAT CCT TAT GAT GTT CCT GAT TAT GCT **ATG** GCC GCC GCC GAG GAG GTG-3'.

Les amplicons PCR obtenus sont séparés sur gel d'agarose 1%, purifié par le kit GeneClean III (bio101) et sous-clonés dans le MCS (*Multiple Cloning Site*) du vecteur rétroviral pMCSVnéo^R (Clontech) (**figure 33**) en utilisant la T4 DNA Ligase (Gibco) dans les conditions préconisées par le fournisseur. Le vecteur receveur (pMSCV néo^R) et l'insert d'intérêt codant pour HA-CK2 β sont préalablement digérés par les enzymes de restriction *EcoR* I et *Bgl* II (Gibco) afin d'orienter le clonage (5U d'enzyme pour 1 μ g d'ADN).

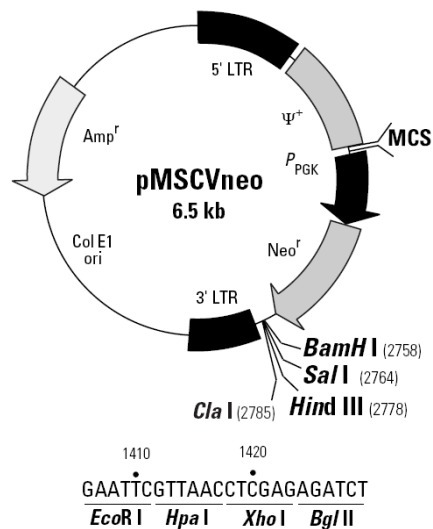


Figure 33 : Carte de restriction et site de clonage multiple (MCS) du vecteur pMSCVneo. (Clontech)

Le virus MSCV (*Murine Stem Cell Virus*) est un vecteur dérivé du virus MESV (*Murine Embryonic Stem Cell Virus*). La transfection d'une lignée cellulaire productrice de virus (lignées Bosc23, Pear, 1993) par le plasmide pMSCV permet d'emballer l'ARN correspondant au vecteur dans des particules rétrovirales infectieuses, mais incapables de se reproduire. Le surnageant rétroviral obtenu est donc composé de particules virales infectieuses déficientes et non lytiques qui peuvent infecter les cellules-cibles et leur transmettre le gène d'intérêt en s'intégrant dans le génome de la cellule hôte. L'expression du gène est possible grâce à la présence de séquences LTR (*long terminal repeat*) présentes en 5' et 3'. Les séquences LTR présentes dans le vecteur pMSCV diffèrent des séquences LTR des autres vecteurs rétroviraux par plusieurs mutations qui évitent l'inhibition de la transcription par les facteurs régulateurs négatifs, présents dans les cellules souches embryonnaires. Le gène de sélection vis à vis des cellules eucaryotes infectées par le virus et qui leur confère une résistance à la néomycine (Neo^r) est le sous contrôle du promoteur murin de la phosphoglycerate-kinase (PKG).

Les divers plasmides obtenus sont amplifiés après transformation dans *Escherichia coli* (souche compétente DH5 α , Gibco) en utilisant le gène de résistance à l'ampicilline présent dans le vecteur. L'ADN plasmidique est extrait des bactéries amp^R et purifié à l'aide du système Qbiogen (lyse alcaline des bactéries, précipitation de l'ADN génomique, adsorption de l'ADN plasmidique sur des billes de silice, élution dans un tampon Tris HCl 10mM pH7,5, EDTA 1mM).

Pour le mutant ciblé à l'interface entre les sous-unités CK2 β (Filhol, 2004), HA-CK2 β ^{Pro110Asp}, une mutagenèse dirigée (Stratagen, *Quick ChangeTM Site Directed Mutagenesis Kit*) est réalisée avec le plasmide pMSCV HA-CK2 β ^{WT}/néo. L'oligonucléotide sens est 5'-GAT TTC GGG TAC TGC GAC CGC GTC TAC TGC-3' et l'anti-sens est 5'-GCA GTA GAC GCG GTC GCA GTA CCC GAA ATC-3'.

Le plasmide pMSCV HA-CK2 β ^{Glu60,61,63Ala}/néo, exprimant le mutant du domaine de liaison *in vitro* aux polyamines, a été généré par clonage, après amplification de l'ADNc correspondant à partir de pSG5 CK2 β ^{Glu60,61,63Ala} (Leroy, 1997), en utilisant les oligonucléotides 5' et 3' décrits ci-dessus afin d'obtenir l'ADNc HA-CK2 β ^{WT}.

I.2/ Production des rétrovirus MSCV Cre/puro^R et MSCV HA-CK2 β /néo^R.

La lignée cellulaire Bosc23 productrice de surnageants rétroviraux non lytiques (Pear, 1993) est cultivée à 37°C, en atmosphère humide 5% CO₂, en milieu DMEM (Gibco, 31966-021), supplémenté par 10% SVF (Gibco) en présence d'antibiotiques (pénicilline 50UI/ml et streptomycine 50 μ g/ml, Gibco). Les cellules sont transfectées lorsqu'elles atteignent un stade confluent en présence de lipofectamine (Gibco) dans les conditions préconisées par le fournisseur, en utilisant 10 μ g d'ADN plasmidique. Après 72h, le surnageant contenant les particules virales est récolté, filtré (pores 0,45 μ m), aliquoté et conservé à -80°C.

I.3/ Culture des cellules ES.

Les lignées de cellules ES murines CK2 β ^{2lox/wt} et CK2 β ^{2lox/-} ont été établies au laboratoire (Buchou, 2003b). Les cellules sont cultivées à 37°C, en atmosphère humide 5% CO₂, dans des boîtes de culture gélatinées (gélatine 1‰ autoclavée, 37°C, 30') en présence d'une monocouche de fibroblastes embryonnaires murins (cellules nourricières) résistants à la néomycine, préalablement traités à la mitomycine C (antimitotique, 10 μ g/ml, Sigma, 3h à 37°C). Le milieu de culture des cellules ES, renouvelé chaque jour, se compose de DMEM 4,5g glucose complémenté en pyruvate (Gibco, 31966), supplémenté par 15% de SVF inactivé par un traitement de 30' à 56°C (Biochrom, sérum certifié pour la culture des cellules ES), de la

pénicilline et de streptomycine (Gibco), du β -mercaptoéthanol 10 μ M (Sigma) et du LIF 1500UI/ml (AbCys S.A). Le LIF (*leukemia inhibitory factor*) est une cytokine permettant de conserver la totipotence des cellules ES.

I.4/ Infection des cellules ES ; obtention de clones stables néo^R et/ou puro^R.

Les cellules sont ensemencées 16h avant l'infection à une densité de 2,5 10⁴ cellules/cm² dans des boîtes de culture de 60mm de diamètre. Le jour de l'infection (J0), le surnageant rétroviral est ajouté au milieu de culture durant 24h, à raison de 1ml pour 4ml de milieu, en présence de polybrène (8 μ g/ml, Sigma), agent facilitant l'entrée des rétrovirus dans la cellule. Pour éviter tout chimérisme dans les colonnies qui seront obtenues après sélection, les cellules ES sont traitées à la trypsine (trypsine-EDTA, Gibco) le lendemain de l'infection rétrovirale et réensemencées à faible concentration. Après 48h (J2), la néomycine (250 μ g/ml) et/ou la puromycine (1,5 μ g/ml) sont additionnées (doses minimales à laquelle les cellules ES sauvages sont éliminées en 5 jours). Le milieu de culture additionné de l'antibiotique de sélection est changé tous les 2 jours. Neuf jours après infection (J9), les clones sélectionnés (néo^R et/ou puro^R), sont repiqués individuellement, amplifiés puis cryo-conservés dans du milieu DMEM, DMSO 10%, SVF 25% à -180°C.

I.5/ Expériences de restauration de la viabilité cellulaire.

Lors de la validation du modèle, ces expériences sont réalisées avec un clone ES *CK2 β ^{2lox/-}* préalablement infecté par le virus MSCV HA-CK2 β ^{WT} /néo^R, un clone ES *CK2 β ^{2lox/-}* et un clone ES *CK2 β ^{2lox/wt}* infectés par le virus MSCVnéo^R. Ces clones sont ensuite infectés par le surnageant rétroviral MSCV Cre/puro^R, en duplicata. L'intégration de l'ADNc Cre et la disparition de l'allèle *CK2 β 2lox* sont suivies par PCR à 4, 6 et 9 jours après infection (J4, J6, J9), sur la population entière ; en parallèle, les colonies résistantes puro^R sont fixées et révélées avec une solution de bleu de méthylène 0,3%, fuchsine basique 0,1% solubilisés dans du méthanol.

Afin d'obtenir des cellules nullizygotes *CK2 β ^{-/-}* dont la viabilité est restaurée par l'expression rétrovirale (exogène) d'un ADNc HA-CK2 β sauvage ou muté, les cellules ES hétérozygotes conditionnelles *CK2 β ^{2lox/-}* sont utilisées. Après une première infection rétrovirale permettant d'obtenir des cellules ES *CK2 β ^{2lox/-}* HA-CK2 β néo^R, l'infection rétrovirale par MSCV Cre/puro est effectuée avec un clone exprimant la protéine exogène (validé après vérification par immunoempreinte en utilisant l'anticorps anti-HA (Roche, clone 12CA5). A J9, les clones néo^R puro^R sont repiqués individuellement puis amplifiés afin de réaliser en parallèle

un génotypage et une cryo-conservation. Le génotypage des clones est réalisé par PCR et Southern Blot, tandis que l'expression de la protéine exogène HA-CK2 β est vérifiée par immunoempreinte (Western Blot). Les cellules destinées à la cryoconservation sont amplifiées en présence de cellules nourricières tandis que les cellules lysées en vue de l'extraction d'ADN génomique sont cultivées sans cellules nourricières afin d'éviter une contamination de l'ADN.

I.6/ Génotypage des clones ES néo^R puro^R.

I.6.a/ Analyse par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Les cellules sont lysées après trois chocs thermiques successifs (azote liquide / 37°C). Les lysats sont traités à la protéinase K (Roche, 200 μ g/ml, 1h à 55°C, 30' à 90°C) dans le tampon utilisé pour la PCR. Celle-ci est réalisée avec 2 μ l de lysat en utilisant la Taq DNA Polymerase (Pharmacia). Les différents allèles CK2 β sont mis en évidence en utilisant différentes amorces (Buchou, 2003b) (**figure 34**). La combinaison des oligonucléotides 3 et 4 permet d'amplifier les allèles CK2 β sauvage (300 pb) et conditionnel (350 pb) tandis que l'allèle nul (200 pb) est amplifié en utilisant les amorces 1 et 4. L'intégration de l'ADNc Cre (150 pb) est mise en évidence en utilisant des amorces spécifiques (Buchou, 2003b) (sens 5'-ATGTCCAATTTACTGACCGTACAC-3' ; Cre antisens 5'-CGCATAACCAGTGAAACAGCATTG-3'). Les conditions de PCR sont : 94°C 5' / (94°C 30", 55°C 30", 72°C 2') X35 / 72°C 8', 4°C ∞ . Les fragments d'ADN obtenus sont séparés sur gel d'agarose 1,5%.

I.6.b/ Analyse par hybridation d'une sonde ADN (Southern Blot).

Les cellules sont lysées 16h à 37°C dans un tampon Tris HCl 100mM pH 8,5, EDTA 5mM, SDS 0,2%, NaCl 200mM contenant de la protéinase K (200 μ g/ml). L'ADN génomique est extrait par précipitation à l'éthanol après avoir éliminé les protéines dénaturées en présence de phénol-chlorophorme-isoamylalcool (25/24/1 ; v/v/v). Après traitement par l'enzyme de restriction *Xho* I (Gibco, 100U / 15 μ g d'ADN) et séparation des fragments par électrophorèse en agarose 0,8%, l'ADN est dénaturé (NaOH 0,5N, NaCl 1,5M, 30'). Le gel ainsi traité est neutralisé (Tris HCl 0,5M pH 7,2, NaCl 1,5M, EDTA 1mM, 2X15') avant que l'ADN ne soit transféré sur une membrane Hybond N⁺ (Amersham) pendant 2h avec un tampon 20X SSC. L'ADN est lié de façon covalente à la membrane après traitement aux UV (120000 μ J). Le tampon d'hybridation rapide (Amersham) est utilisé selon les conditions préconisées (pré-hybridation 1h à 65°C puis hybridation sur la nuit à 65°C). L'hybridation est réalisée avec une sonde d'ADN spécifique du gène CK2 β murin (Buchou, 2003b) (**figure 34**). La sonde, qui

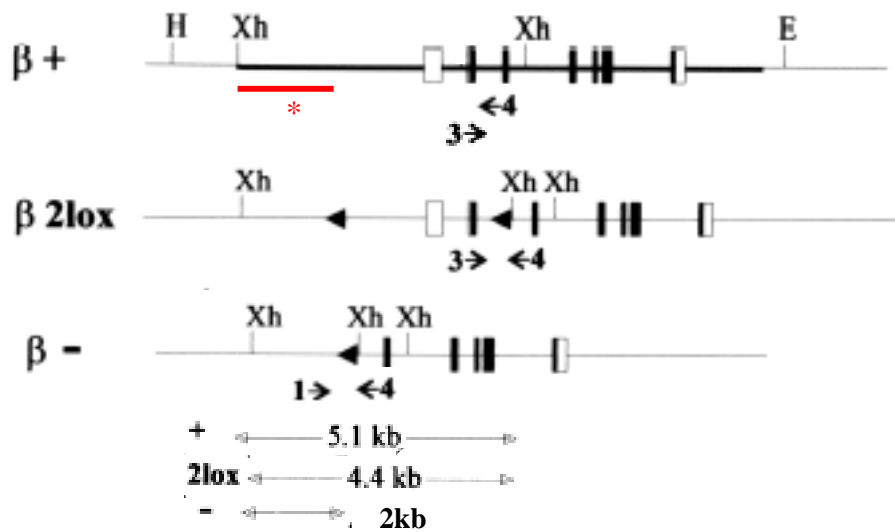


Figure 34 : Génotypage des cellules ES : allèles $CK2\beta$. (Buchou, 2003b)

L'allèle sauvage (β^+), l'allèle nul (β^-) et l'allèle conditionnel (β^{2lox}) sont distinguables par PCR en utilisant les amorces représentées sur la figure. La combinaison des oligonucléotides 3 et 4 permet d'amplifier les allèles *CK2β* sauvage (300 pb) et conditionnel (350 pb) tandis que l'allèle nul (200 pb) est amplifié en utilisant les amorces 1 et 4.

Amorce 1 : 5'-GAGGGCATAGTAGATATGAATCTG-3'

Amorce 3 : 5'-ATGAGTAGCTCTGAGGAGGTG-3'

Amorce 4 : 5'-GGATAGCAAACCTCTCTGAG-3'

La taille des fragments reconnus par la sonde (*) utilisée pour le Southern Blot après digestion de l'ADN génomique par XhoI (sites Xh) est mentionnée au bas de la figure.

correspond à un fragment du gène *CK2β*, est synthétisée en présence d'UDP-fluorescéine (Amersham, *Gene Images Random Prime Labelling Module*). La membrane est traitée 30' à 65°C successivement avec des solutions salines de plus en plus stringentes vis-à-vis de l'hybridation de la sonde sur l'ADN génomique (2X SSC, 1X SSC, 0,5X SSC, en présence de 0,1% SDS). Les sites aspécifiques de la membrane sont ensuite saturés avec une solution 'Block' (Amersham). La membrane est enfin incubée en présence d'un anticorps anti-fluorescéine couplé à la peroxydase. L'activité de la peroxydase est détectée par chemiluminescence après incubation de la membrane avec le substrat 'CDP Star' (Amersham).

I.7/ Analyse de l'expression des protéines HA-CK2β exogène et CK2β endogène par immunoempreinte (Western Blot).

Les cellules sont lysées 15' à 4°C dans un tampon Tris HCl 50mM pH 7,5, EDTA 5mM, NaCl 0,5M, Triton X100 1%, leupeptine 25µg/ml, aprotinine 25µg/ml, AEBSF 0,5mM. Les lysats sont éclaircis par centrifugation et le contenu protéique des extraits obtenus est dosé (kit *BCA protein assay*, Pierce). Les protéines (40µg) sont séparées sur gel de polyacrylamide 12% ou 15% en présence de SDS puis transférées (100V, 1h, 4°C) sur une membrane de nitrocellulose 0,22µm (Schleicher & Schuell). La membrane est incubée 1h à température ambiante dans une solution de PBS/I-Block 0,2% (Tropix) avant d'être incubée 16h à 4°C avec un anticorps primaire en solution dans le I-Block. Après élimination des anticorps excédentaires avec un tampon de lavage PBS/0,05% Tween 20, la membrane est incubée 45' à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-IgG marqué à la peroxydase. L'immunodétection est finalement révélée par chemiluminescence (*ECL Detection System*, Amersham).

L'anticorps primaire anti-CK2β utilisé est un anticorps polyclonal (IgG) de lapin 'βCter' dirigé contre les résidus 205-215 ; l'anticorps anti-HA est un anticorps monoclonal (IgG) développé chez la souris (Roche, clone 12CA5).

Les anticorps secondaires (Sigma) sont développés chez la chèvre ; ils sont dirigés contre la partie constante de l'anticorps primaire et couplés à la peroxydase.

II/ Caractérisation des lignées cellulaires $CK2\beta$ -/- exprimant une forme exogène HA- $CK2\beta$

Afin de limiter l'effet clonal, l'étude est réalisée avec un mélange de 2 clones pour chaque lignée ES $CK2\beta$ -/- HA- $CK2\beta$ sauvage ou mutante, néo^R puro^R.

II.1/ Etude de la prolifération des cellules ES.

Les cellules sontensemencées 72h avant l'étude à une densité de $1,5 \cdot 10^6$ cellules/cm² dans des boîtes de culture de 100mm de diamètre, en absence de cellules nourricières. A J0, les cellules ES sont mises en culture, en duplicata, dans des boites 6 puits gélatinées, à raison de $1 \cdot 10^5$ cellules par puit, dans 4 mL de milieu de culture supplémenté par du Lif et en présence de néomycine. A J1, J2, J3 et J4, les cellules sont mises en suspension après action de la trypsine et comptées.

Leur prolifération est comparée à celle d'une lignée de cellules exprimant la protéine HA- $CK2\beta$ ^{WT}, pour laquelle la recombinaison ne s'est pas effectuée (lignée contrôle $CK2\beta$ 2lox/- HA- $CK2\beta$ ^{WT}, néo^R puro^R).

II.2/ Différenciation des cellules ES D/R en cellules neurales.

Après un passage sur cellules nourricières, en présence de milieu de culture supplémenté par du Lif et en présence de néomycine pendant 48h, les cellules sont mises en suspension puisensemencées à raison de $1,5 \cdot 10^5$ cellules par mL, dans des boites de pétri de 100mm de diamètre non traitées pour la culture cellulaire (culture non adhésive). Le milieu de culture est composé de DMEM 4,5g glucose (Gibco), supplémenté par 10% SVF (Biowest 2004), de la pénicilline et de la streptomycine (Gibco). Les cellules vont alors former des agrégats flottants considérés comme des corps embryoïdes. A J4, les corps sont mis en présence de 5µM d'acide rétinoïque pour 4 jours supplémentaires. A J8, les corps embryoïdes sont incubés 2 fois dans un large volume de PBS, laissés sédimenter ou centrifugés à 500 rpm 5', avant d'être dissociés par l'action de la trypsine 5' à 37°C. L'action de la trypsine est arrêtée par le milieu de culture utilisé pour les corps embryoïdes, et les cellules sont dissociées mécaniquement dans un grand volume de PBS - SVF 0,5 % avant d'être centrifugées 5' à 1000 rpm. Le culot est repris dans du milieu type « neurosphères » (DMEM / F12 (1 :1) (Gibco) ; B27 (Gibco) ; EGF 10 mg/ml final ; bFGF 10 mg/ml final ; BSA 0,1% final (fraction IV 10 % filtrée 0,22 µm) ; pénicilline - streptomycine). Les cellules sontensemencées dans une boite de

culture de type bactériologie (conditions de culture non adhésive). Les facteurs de croissance (EGF 10 mg/ml final ; bFGF 10 mg/ml final) sont ajoutés tous les 2 jours.

Au bout de 8 jours, les neurosphères générées sont incubées en présence de PBS avant d'être ensemencées en conditions adhésives sur lamelles stérilisées par chaleur sèche (autoclave) et traitées à la poly-L-lysine 0,01% (Sigma) (16h à 37°C). Le milieu de différenciation (DMEM / F12 (1 :1) ; B27 ; BSA 0,1% final (fraction IV 10 % filtrée 0,22 µm) ; SVF 3,5% (Biowest 2004) ; pénicilline - streptomycine) est renouvelé par moitié tous les 2 jours.

II.3/ Coloration hématoxyline/éosine des corps embryoides.

Les corps embryoides obtenus à partir de deux boîtes de culture (100mm de diamètre) sont rassemblés et centrifugés 5' min à 500 rpm, puis le culot est resuspendu dans 10 ml PBS. Les EBs sont sédimentés ou soumis à centrifugation 5' à 250/300 rpm. L'opération est renouvelée une seconde fois, puis les corps sont fixés en présence de paraformaldéhyde 4% dans PBS, pendant 1h à 4°C. Le pipetage est réalisé avec des pointes plastiques siliconées afin d'éviter la perte d'une grande quantité d'EBs sur le plastique. Après deux incubations avec du PBS, les corps embryoides sont incubés successivement 1h dans du PBS - 10% sucrose, puis dans du PBS - 20% sucrose. Les EBs sont transférés dans un volume minimal (200 à 300 µl) à l'intérieur d'une cupule d'inclusion et centrifugés 5' à 250/300 rpm avant d'être inclus dans du Tissue-Teck (OCT Compound, Sakura) à -70°C (EtOH/carboglace). Les inclusions sont stockées à -20°C avant d'être sectionnées en coupe de 10 µm d'épaisseur à l'aide d'un cryotome LEICA CM 3000. Les coupes sont déposées sur lames traitées à la polylysine (Menzel-Gläser).

Le protocole de coloration hématoxyline-éosine dérive de celui utilisé pour les tératocarcinomes (voir **III**).

II.4/ Extraction d'ARN à partir de corps embryoides et RT-PCR.

Les corps embryoides sont récupérés à J4 (avant l'addition d'acide rétinoïque) et J8 (soit quatre jours après l'action du morphogène). Ils sont incubés dans une solution de PBS puis lysés dans un volume de 300µL par boîte de 10 cm de diamètre en présence de tampon A (solution autoclavée de 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂ additionnée de 0,65% de Nopp40) à 4°C pendant 1' au maximum avant d'être centrifugés à 1500 rpm à 4°C pendant 5'. Le surnageant, correspondant aux ARNs cytoplasmiques, est mélangé à température ambiante dans un volume identique de Tampon B (solution autoclavée de 10 mM

Tris-HCL pH 7.5, 10 mM EDTA, 350 mM NaCl, 7M urée, 1% SDS). Après addition de 1,8 volume de phénol-chloroforme-isoamylalcool (50% - 48% - 2% ; v/v), la solution d'ARNs est centrifugée à 14000 rpm à 4°C pendant 5'. Les ARNs contenus dans le surnageant sont précipités par 2 volumes d'éthanol 100% pendant 4h à -80°C ou 16h à -20°C, avant d'être centrifugés à 14000 rpm à 4°C pendant 30'. Le culot est ensuite traité avec 500 µL d'éthanol 70% qualité ARN (l'eau utilisée est traitée par du diéthylpyrocarbonate ou DEPC) puis séché avant que les ARNs ne soient repris dans 20µL d'eau traitée au DEPC et conservé à -20°C.

La transcription reverse est réalisée avec 5µg d'ARN totaux, selon les conditions préconisées par le fournisseur (InVitrogen, *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR*). La réaction de PCR est réalisée avec 1 µL de produit obtenu en présence de polymérase Taq Pharmacia. Les conditions de PCR sont : 94°C 2' / (94°C 1', 58°C 30", 72°C 30") X30 / 72°C 5', 4°C ∞. Les fragments obtenus sont séparés sur gel d'agarose 1,5%.

Les amorces suivantes sont utilisées (Nakano, 2005) :

Melk :	sens	5'-CTTGGATCAGAGGCAGATGTTTGGAG-3'
	antisens	5'-GGACCCAGTACGTTCTAATGGCT-3'
Sox2 :	sens	5'-ACCGGCGGCAACCAGAAGAACAG-3'
	antisens	5'-TATTTATGGCCGCGCCGCG-3'
GAPDH :	sens	5'-TTCACGACATACTCAGCA-3'
	antisens	5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3'

II.5/ Analyse par immunohistochimie des neurosphères après différenciation.

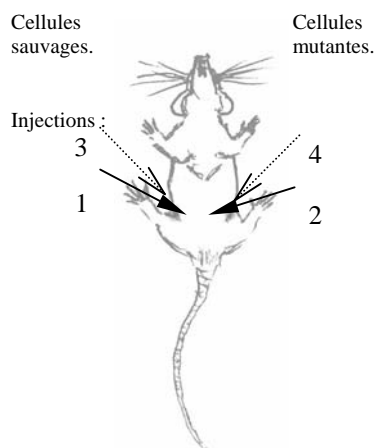
L'anticorps anti-O4 (IgM de souris, surnageant d'hybridome, fourni gracieusement par Soula C, Université Paul Sabatier de Toulouse) est incubé au 1/10^{ème} dans le milieu de culture, avec les cellules vivantes, pendant 20' à 37°C. Les cellules sont ensuite fixées en présence de paraformaldéhyde 4% dans PBS, pendant 20 min. Après 3 traitements successifs de 5' au PBS, les cellules sont perméabilisées et saturées 10' dans une solution de PBS - 0,2 % triton X100 - 5 % sérum de chèvre avant d'être à nouveau traitées 3 fois au PBS, puis incubées 16h à 4°C en présence d'un second anticorps primaire, dans une solution de PBS - 0,05 % triton X100 - 1,25 % sérum de chèvre. Cet anticorps est choisi parmi : un anticorps anti-GFAP (monoclonal de rat, USBiological, 1/500^{ème}), un anticorps anti-Tuj1/βIII tubuline (IgG de souris, Babco, 1/500^{ème}), un anticorps anti-HA (IgG de souris, Roche, 1/500^{ème}) ou un anticorps anti-CK2α (polyclonal de lapin, 1/200^{ème}). Afin d'éliminer les anticorps excédentaires, les cellules sont traitées 3 fois 5' avec du PBS puis incubées 1h à température ambiante et à l'obscurité avec les anticorps secondaires dans une solution de PBS - 1% sérum de chèvre (anticorps de chèvre

anti-IgM de souris, couplé avec la cyanine 3, $1/500^{\text{ème}}$; anti-IgG de souris couplé avec la cyanine 2, $1/50^{\text{ème}}$ ou avec de l'Alexa488, $1/500^{\text{ème}}$; anti-immunoglobulines de rat couplé avec l'Alexa488, $1/500^{\text{ème}}$; anti-immunoglobulines de lapin couplé avec l'Alexa488, $1/500^{\text{ème}}$). Après 3 nouveaux traitements au PBS, les cellules sont incubées en présence d'une solution de PBS - Hoechst 2 $\mu\text{g/ml}$ pendant 5', traitées une fois au PBS puis incubées rapidement dans de l'eau distillée. Les lamelles sont séchées avant d'être montées sur lame de verre avec une solution type *Dako Fluorescent mounting Medium* et scellées au vernis. Les lames sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière.

III/ Induction et analyse histologique de tératocarcinomes. (Langa, 2000)

III.1/ Induction de tératocarcinomes à partir de cellules souches embryonnaires.

Les cellules ES utilisées sont des lignées initialement dérivées de souris 129/SvPas@Ico. Les cellules nourricières ("feeder cells") sont éliminées de la culture de cellules ES après au moins deux passages successifs sur gélatine. Les cellules ES sont ensuite traitées à la trypsine, comptées et mises en suspension avec une solution de PBS. 5.10^6 cellules ES, dans 300 μ L de PBS, sont requises par injection. Les souris utilisées sont des mâles immunodéficients SWISS-nu/nu (Ico;Swiss-Foxnn 1^{nu}) ou 129/SvPas@Ico âgés de 4 à 6 semaines.



L'injection sous-cutanée se fait suivant le schéma ci-contre, au niveau des deux chaînes ganglionnaires mammaires (injections 1 et 2) et/ou sur les flancs dorsaux (injections 3 et 4). Les injections sont réalisées sous anesthésie générale. Doses : Xylasine (10 mg/kg), Kétamine (75 mg/kg). Cinq à dix souris sont utilisées, chacune ayant subi une injection collatérale de cellules « sauvages » (ES $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{WT}$) et de cellules « mutantes » (ES $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{\Delta 2}$).

Les tumeurs sont visibles dès le 10^{ème} jour après l'injection et sont récupérées au bout de 2 à 3 semaines. Le diamètre de chaque tératocarcinome ne doit pas dépasser 1 cm, soit au total moins de 10 % du poids de l'animal (une souris Sv129Pas@Ico à cet âge pèse de 20 à 28 g, une souris SWISS-nu/nu de 22 à 25 g).

Les tumeurs sont excisées après euthanasie de l'animal par dislocation cervicale. Après pesée, les tumeurs sont soit congelées dans un tube plongé dans de l'azote liquide (analyse protéique) soit incubées dans une solution de paraformaldéhyde 4% dans PBS (analyse histologique).

III.2/ Analyse protéique des tumeurs.

Les tumeurs cryogénisées dans l'azote liquide sont décongelées puis dilacérées avant d'être incubées à 4°C dans le tampon de lyse (25 mM Tris HCl pH 8.5, 1mM DTT, 200 mM NaCl, 5mM EDTA, leupeptine 25 μ g/ml, aprotinine 25 μ g/ml, AEBSF 0,5mM), à raison de 600 μ L pour 100 mg de tissus. Les tumeurs sont ensuite broyées en employant un ultraturax 3 fois

10" à 4°C, puis traitées par sonication 2 fois 30". Les lysats sont centrifugés à 4°C pendant 25' à 14000 rpm. Le contenu protéique des surnageants est dosé par la méthode de Bradford.

L'analyse protéique par immunoempreinte est réalisée selon le protocole décrit précédemment (voir I.7)

III.3/ Fixation, inclusion paraffine, coupe, coloration et immunohistologie des tératocarcinomes.

Les tumeurs fraîchement excisées et fixées avec une solution de PBS – 4% paraformaldéhyde durant 16h à 4°C sont transférées dans une solution d'éthanol 70%, dans laquelle elles peuvent être conservées à 4°C.

Les tumeurs sont déshydratées à 4°C par transfert successif dans des bains d'éthanol (80%-1h30, 90%-1h30, 96%-1h30, 100%-1h30) avant d'être incubées en présence de xylène pendant 12h. Les tumeurs sont ensuite transférées dans deux bains successifs de paraffine liquide à 60°C, pendant 1h30 avant d'être incluses. Les inclusions sont conservées à 4°C avant d'être sectionnées en coupes de 5µm qui sont récupérées sur lame en verre pour la coloration, ou sur lame traitée à la polylysine pour l'immunohistologie. Après une incubation à 60°C pendant 1h, les lames sont gardées à température ambiante pour la coloration ou à 4°C pour l'immunohistologie.

Pour procéder à la coloration, les coupes sont incubées 6' dans du xylène, puis dans de l'éthanol 100% 3 fois 30" avant d'être réhydratées sous un filet d'eau courante. La coloration à l'hématoxylline (Gill's n°2 Sigma GHS-2-16) est réalisée pendant 3'. Après une incubation rapide dans l'eau, les coupes sont incubées dans une solution de *Scott's Top Water* pendant 2' (0,2%NaHCO₃, 1%MgSO₄) avant un nouveau traitement à l'eau puis à l'éthanol 100%. La coloration à l'éosine (Y solution aqueuse Sigma HT110-2-16) s'effectue pendant 5'. Après un traitement à l'eau puis à l'éthanol 100% 2 fois 3', deux incubations de 3' chacune dans du xylène sont réalisées avant le montage des lamelles avec du Merckoglas (Merk).

Pour l'immunohistologie, les coupes sont d'abord réhydratées par un traitement successif au xylène (2 fois 10'), à l'éthanol (100%, 10' ; 90% 10' ; 70%, 10'), puis à l'eau distillée (5 min). Un traitement au citrate de sodium 10mM pH6 (A, 0,1M acide citrique ; B, 0,1M citrate de sodium, conservé à 4°C. 9ml A+41ml B dans 500ml final eau distillée) s'effectue dans un bain-marie bouillant (micro-onde 800W) : 10' microonde-5' au repos/5'-5'/5'-5'/5'-20'. Les coupes sont ensuite incubées pendant 20' dans un bain de méthanol contenant 1% de H₂O₂ (préparé extemporanément à partir de H₂O₂ Sigma 30%, conservé à 4°C) afin d'éliminer les peroxydases endogènes, puis dans un bain d'eau distillée durant 5'. Afin de limiter les volumes utilisés, les coupes sont alors entourées de Dakopen. Une première

incubation de 5' dans une solution de TBS - Tween 20 0.05% (TBS : 25mM Tris-HCl pH7,4, 8gr NaCl, 0,2gr KCl) est suivie d'une incubation de 20' dans une solution de TBS - 1% BSA (filtrée à 0,8 μ m) contenant 5% de sérum de chèvre afin de perméabiliser les cellules et d'éliminer les interactions non spécifiques. L'anticorps primaire (anticorps de lapin anti-phosphosérine 10 de l'histone H3, Upstate) est mis en présence des coupes durant 16h à 4°C au 1/2000^{ème} dans une solution de TBS - 1% BSA - 5% sérum de chèvre. Après élimination des anticorps excédentaires par 3 traitements successifs par une solution de TBS - Tween, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire (chèvre anti-immunoglobulines de lapin, biotinylé, Dako) au 1/300^{ème} dans une solution de TBS - BSA 1% - sérum 5% pendant 45'. Après 3 traitements dans une solution de TBS - Tween, le complexe ABC-peroxydase (Dako KO355) est ajouté pendant 45' à température ambiante selon les recommandations du fournisseur, puis l'excédent est éliminé par 2 traitements successifs avec une solution de TBS. Afin de concrétiser la révélation, les coupes sont incubées en présence de DAB (Dako K3465) pendant 5 à 10'. Après un transfert successif dans de l'eau (5'), de l'éthanol 100% (2 fois 3') et du xylène (2 fois 3'), le montage entre lame et lamelle s'effectue en présence de Merckoglas (Merk).

.RESULTATS.

I/ Mise au point et validation du modèle cellulaire nécessaire à l'étude de la protéine CK2 β

Ce modèle repose à la fois sur une stratégie d'inactivation conditionnelle du gène *CK2 β* dans les cellules souches embryonnaires (ES) de souris (système Cre-Lox) (Buchou, 2003b) et sur l'expression exogène de la protéine CK2 β . Afin d'exprimer les protéines d'intérêt dans les cellules souches embryonnaires (protéine CK2 β exogène et recombinaise), des infections rétrovirales sont réalisées (**figure 32**), utilisant le système pMSCV (**figure 33**).

La première étape consiste à générer la lignée cellulaire *CK2 β ^{lox/-}* (hétérozygote conditionnelle) exprimant la protéine CK2 β sauvage (CK2 β ^{WT}). Ceci est réalisé par une infection des cellules par le surnageant rétroviral permettant l'expression stable de la protéine exogène CK2 β ^{WT}. La forme exogène de la protéine est fusionnée avec le peptide HA dérivant de la protéine hémagglutinine du virus de l'influenza, afin de la distinguer de la protéine endogène. Après clonage de la séquence ADN codant la protéine HA-CK2 β ^{WT} dans le vecteur rétroviral, le plasmide pMCSVNéo^R (*Murine Stem Cell Virus*, portant le gène de résistance à la néomycine), les rétrovirus défectifs sont obtenus après transfection de cellules *helpers* (Bosc23). Ces rétrovirus sont capables d'infecter les cellules ES *CK2 β ^{lox/-}* sans pouvoir se répliquer et lyser la cellule hôte.

La seconde étape concerne l'expérience d'inactivation conditionnelle et restauration de la viabilité cellulaire en elle-même. La séquence ADN codant pour la recombinaise Cre du bactériophage P1, clonée dans le plasmide pMCSVpuro^R (gène de résistance à la puromycine), reconnaît les séquences de type lox introduites de part et d'autre du site d'initiation de la traduction du gène *CK2 β* et les excise 2 à 2, ce qui permet de générer un allèle nul (-) (Buchou, 2003b). Le surnageant rétroviral correspondant permet de générer, après double sélection (résistance à la néomycine et la puromycine), des cellules ES dépourvues de protéine endogène (cellules *CK2 β ^{-/-}*) exprimant de façon stable la protéine HA-CK2 β ^{WT} (**figure 35a**).

Les clones cellulaires néo^R puro^R sont génotypés afin de vérifier l'inactivation du gène conditionnel, et le fait que la survie des cellules soit imputable à la présence de la protéine exogène HA-CK2 β ^{WT}. 35 clones ont ainsi été testés par PCR. Les clones susceptibles d'être nullizygotés sont ensuite vérifiés par *Southern Blot*. Seuls 3 clones se sont révélés être clairement nullizygotés, ce qui signifie que dans plus de 90% des cas, l'inactivation de l'allèle conditionnel n'a pas eu lieu (**figure 35b et 35c**). Ceci peut être expliqué par le fait que l'intégration du virus dans le génome des cellules ES est sélectionnée par la présence de

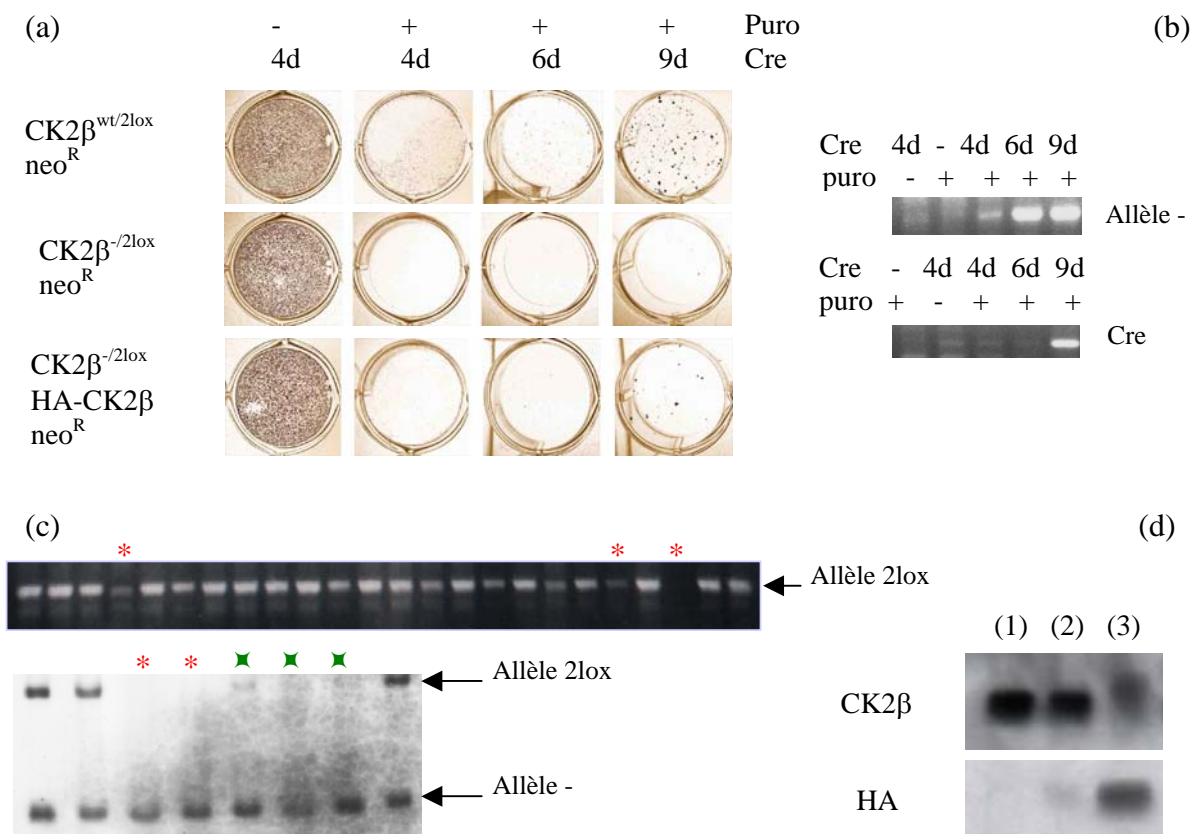


Figure 35 : Validation du système d’inactivation conditionnelle et restauration de la viabilité cellulaire.

(a) Restauration de la viabilité des cellules souches embryonnaires (ES) CK2β^{2lox/-} néo^R exprimant la protéine exogène HA-CK2β^{wt} après infection des cellules par le rétrovirus pMSCVpuro/Cre . Les cellules ES CK2β^{wt/2lox} et CK2β^{2lox/-} ont été infectées en parallèle et servent de contrôle positif et négatif respectivement.

(b) Vérification par PCR de l’insertion du rétrovirus pMSVCpuro/Cre dans le génome des cellules ES (apparition de l’allèle « Cre ») et de l’efficacité de la recombinaison (apparition de l’allèle nul (-)). Cette vérification est réalisée à partir de la population entière de cellules sélectionnées en présence de puromycine.

(c) Génotypage par PCR des clones néo^R puro^R. Le génotypage par PCR permet d’éliminer 90% des clones testés chez lesquels l’inactivation n’a pas eu lieu malgré la pression de sélection (puromycine). Les clones présumés nullizygotes (*) sont ensuite génotypés par Southern Blot. Noter la présence de chimères hétérozygotes et nullizygotes (■)

(d) Analyse par immunoempreinte des lysats de cellules CK2β^{2lox/-} (1), CK2β^{2lox/-} HA-CK2β^{WT} (2), et CK2β^{-/-} HA-CK2β^{WT} (3). Utilisation de l'anticorps anti-CK2β (panneau du haut) et de l'anticorps anti-HA (panneau du bas). On remarque l'absence complète de la protéine CK2β endogène en (3) ainsi qu’une compensation du niveau d’expression de la protéine exogène, ce qui suggère qu’un niveau minimal de protéine CK2β est nécessaire à la survie cellulaire.

puromycine dans le milieu de culture, mais le gène de la recombinaise n'a pas les mêmes éléments régulateurs que le gène de résistance à l'antibiotique. Les cellules se révèlent donc puro^R sans garantie d'expression de la recombinaise Cre.

Enfin, l'analyse protéique des lysats de cellules parentales ($CK2\beta^{2lox/-}$), des cellules néo^R ($CK2\beta^{2lox/-}$ HA-CK2 β^{WT}) et des cellules néo^R puro^R ($CK2\beta^{-/-}$ HA-CK2 β^{WT}) est réalisée (**figure 35d**). Malgré l'utilisation d'un vecteur viral adapté aux cellules souches (pMSCV, Clontech), l'expression de la protéine exogène est extrêmement faible dans les cellules $CK2\beta^{2lox/-}$ HA-CK2 β^{WT} néo^R. D'autre part, ce niveau d'expression augmente fortement après l'inactivation du gène endogène. Cette compensation du niveau d'expression de la protéine exogène suggère qu'un niveau minimal de protéine CK2 β est nécessaire à la survie cellulaire. La régulation de la concentration de CK2 β dans une lignée stable étant réalisée par rapport à la concentration en sous-unité catalytique CK2 α (Lüscher & Litchfield, 1994).

Malgré un faible rendement d'obtention des clones $CK2\beta^{-/-}$ HA-CK2 β^{WT} , le modèle cellulaire proposé est fonctionnel. La génération de lignées cellulaires exprimant exclusivement une forme mutante de CK2 β permet à présent d'étudier dans un système intégré et complexe, les fonctions de différents domaines essentiels à la fonction de la protéine *in vitro*. Ce modèle cellulaire permet de connaître l'implication de ces différents domaines vis-à-vis de la survie cellulaire. Les cellules ES "restaurées" permettent une étude comparative de différents paramètres cellulaires tels que la prolifération et la différenciation. En reliant le phénotype des cellules ES différenciées aux diverses formes mutées de CK2 β , une cartographie moléculaire précise de la fonction modulatrice de CK2 β peut être réalisée.

II/ Expériences d'inactivation conditionnelle et restauration de la viabilité cellulaire par des mutants de la protéine CK2 β

Outre la forme CK2 $\beta^{\Delta 2}$ exprimée dans les tumeurs, différents mutants de CK2 β ont été choisis selon la pertinence de précédentes études biochimiques (Boldyreff, 1993 ; Meggio, 1993 ; Lüscher & Litchfield, 1994 ; Leroy, 1997 ; Filhol, 2004a) et cristallographiques (Niefind, 2001). Ces mutants affectent des domaines modifiant l'activité enzymatique des sous unités catalytiques *in vitro*. Il s'agit du mutant CK2 $\beta^{\text{Glu60,61,63Ala}}$, concernant le domaine acide exposé à la surface de la protéine et reconstituant une holoenzyme hyperactive (Boldyreff, 1993 ; Leroy, 1997) et du mutant CK2 $\beta^{\text{Pro110Asp}}$, relatif au domaine en doigt de zinc à l'interface du dimère CK2 β_2 générant une holoenzyme qui se comporte de façon similaire à la sous-unité catalytique seule (Filhol, 2004a). L'impact du mutant affectant les sites d'autophosphorylation, CK2 $\beta^{\text{Ser2,3,4Ala}}$, qui génère une protéine dont la stabilité est altérée *in vivo* (Zhang, 2002) et qui ne restaure pas la viabilité chez la Drosophile (Jauch, 2002), a également été étudié par l'intermédiaire de ce système cellulaire.

La génération des lignées cellulaires ES CK2 $\beta^{2lox/-}$ exprimant les différents mutants de CK2 β a permis de réaliser les expériences d'inactivation conditionnelle et restauration de la viabilité cellulaire. Les cellules ES CK2 $\beta^{-/-}$ exprimant les différents mutants de la protéine CK2 β , à savoir HA-CK2 $\beta^{\Delta 2}$, HA-CK2 $\beta^{\text{Ser2,3,4Ala}}$, HA-CK2 $\beta^{\text{Glu60,61,63Ala}}$ et HA-CK2 $\beta^{\text{Pro110Asp}}$, ont été générées avec succès. Le tableau 1 récapitule les résultats obtenus après génotypage des clones néo^R puro^R.

Le système cellulaire est définitivement validé puisque la viabilité des cellules CK2 $\beta^{-/-}$ est restaurée par l'expression des différents mutants de la protéine exogène HA-CK2 β .

(figure 36)

(a)

Protéine exogène exprimée	Nombre de clones testés	Nombre de clones nullizygotes	Efficacité de recombinaison
HA-CK2 β ^{WT}	35	3	8,5 %
HA-CK2 β ^{Δ2}	35	2	5,7 %
HA-CK2 β ^{Ser2,3,4Ala}	48	6	12,5 %
HA-CK2 β ^{Glu60,61,63Ala}	48	1	2,1 %
HA-CK2 β ^{Pro110Asp}	48	8	16,6 %

(b)

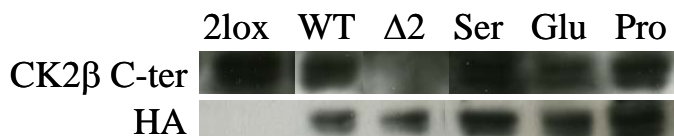


Figure 36 : Résultats des expériences d'invalidation et restauration de la viabilité des cellules souches embryonnaires.

(a) Statistiques.

(b) Vérification du niveau d'expression de la protéine exogène dans les différentes lignées obtenues. (cf matériel et méthode pour le détail des anticorps)

III/ Étude phénotypique des lignées cellulaires $CK2\beta^{-/-}$ exprimant une forme exogène mutante de $CK2\beta$.

Les cellules souches embryonnaires représentent un outil de choix pour l'étude de la balance prolifération, différenciation et survie cellulaires. Cette homéostasie est dérégulée lors du processus tumoral. Les corps embryoides formés après différenciation récapitulent les phases précoces du développement embryonnaire. On détecte en effet dans ses structures la présence des 3 feuillets germinatifs (endoderme, ectoderme, mésoderme). L'analyse des corps embryoides permet donc une étude générale de la différenciation des cellules ES. D'autre part, à partir de corps embryoides, il est possible de cibler un lignage cellulaire particulier en ajustant les conditions de culture.

L'étude phénotypique des différentes lignées cellulaires est une étude comparative : le comportement de référence est celui des cellules nullizygotes restaurées par la forme sauvage.

III.1/ Prolifération cellulaire.

Les études de prolifération cellulaire (*figure 37*) montrent que le temps de doublement des différentes lignées mutantes par rapport aux cellules nullizygotes exprimant la forme exogène sauvage n'est pas affecté.

Tous les mutants permettent donc non seulement la restauration de la viabilité des cellules $CK2\beta^{-/-}$ mais également leur prolifération. Ces résultats suggèrent que les domaines mutés ne soient pas impliqués dans la prolifération des cellules ES, ou du moins que la concentration d'holoenzyme fonctionnelle (c'est à dire assurant la phosphorylation des substrats β -dépendants) pour chaque type de mutant est suffisante pour assurer le processus prolifératif (Blond, 2005). Il est important de noter que les cellules ES ont un cycle cellulaire particulier : les points de contrôle du cycle, en particulier ceux impliqués dans la transition G1/S ne sont pas fonctionnels (Burdon, 2002).

III.2./ Différenciation.

Les cellules ES sont cultivées en présence de facteurs tels que le LIF, préservant leur multipotence, et croissent en colonies tridimensionnelles. En modifiant les conditions de culture, notamment en empêchant totalement l'adhésion cellulaire et en supprimant l'apport de LIF, les cellules vont former des amas au sein desquels elles s'organisent et se différencient. Ces amas sont appelés corps embryoides.

Toutes les lignées mutantes sont capables de former des corps embryoides.

	J0	24h	48h	72h	96h
HA-CK2 β ^{WT}	100 000	138 900	368 000	1 187 300	2 220 200
HA-CK2 β ^{Δ2}	100 000	119 800	382 600	1 179 700	2 682 800
HA-CK2 β ^{Ser2,3,4Ala}	100 000	180 400	451 600	1 246 800	2 479 600
HA-CK2 β ^{Glu60,61,63Ala}	100 000	180 300	486 300	1 376 800	2 924 900
HA-CK2 β ^{Pro110Asp}	100 000	130 800	327 700	1 370 500	2 507 900
2lox/- HA-CK2 β ^{WT}	100 000	209 500	599 000	1 356 900	2 557 900

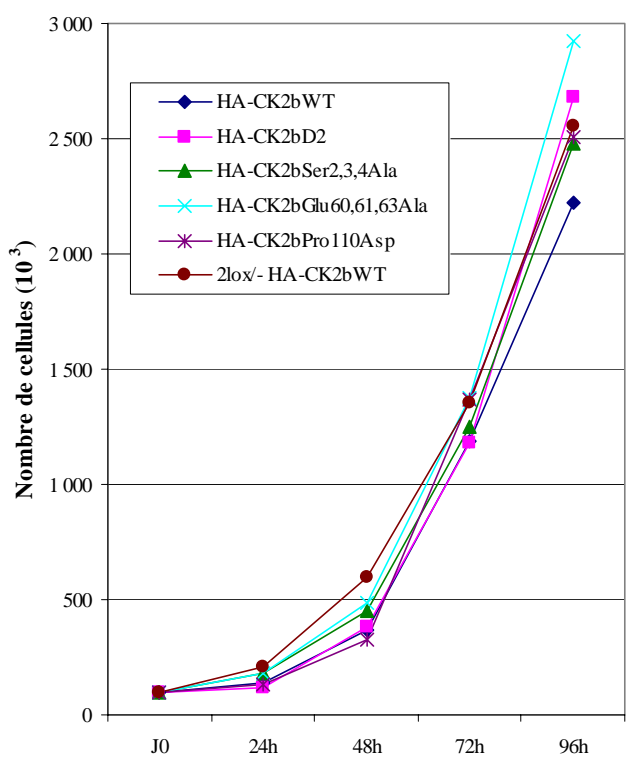


Figure 37 : Etude de la prolifération des lignées cellulaires CK2 β -/- exprimant une forme exogène HA-CK2 β .

A J0, les cellules ES sont mises en culture, en duplicata, dans des boites 6 puits gélatinées, à raison de 1.10^5 cellules par puit, dans 4 mL de milieu de culture supplémenté par du Lif et en présence de néomycine. A J1, J2, J3 et J4, les cellules sont mises en suspension après action de la trypsine et comptées. Le tableau récapitule les valeurs moyennes obtenues, utilisées pour la représentation graphique.

La prolifération des cellules est comparée à celle d'une lignée de cellules exprimant la protéine HA-CK2 β ^{WT}, pour laquelle la recombinaison ne s'est pas effectuée (lignée contrôle CK2 β 2lox/- HA-CK2 β ^{WT}, néo^R puro^R).

Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

En modifiant la composition du milieu, l'étude du rôle de CK2 β dans une voie de différenciation particulière peut être abordée. Le projet a été réorienté plus spécifiquement vers la différenciation neurale. En effet, l'inactivation conditionnelle du gène chez la souris, ciblée dans les précurseurs neuraux a montré une implication de CK2 β dans l'oligodendrogenèse (*manuscrit en préparation*).

Pour évaluer la contribution des différents domaines de CK2 β aux mécanismes de différenciation neurale, un système de différenciation des cellules ES a été mis en place (*figure 38a*). Les cellules ES parentale (CK2 $\beta^{lox/-}$), après soustraction du Lif et en absence d'adhésion, se différencient en cellules organisées en corps embryoides. La quantité de précurseurs neuraux contenus dans ses corps est favorisée par l'addition d'acide rétinoïque. Ces précurseurs sont ensuite sélectionnés après dissociation des corps par prolifération en milieu non adhésif en présence de EGF et de bFGF2. Les neurosphères ainsi formées sont capables de générer les 3 lignées neurales majoritaire du système nerveux central (neurones, astrocytes et oligodendrocytes) après incubation sur lamelles de poly-L-lysine en présence de sérum et soustraction des facteurs de croissance (*figure 38b*).

L'expression de la forme exogène sauvage de la CK2 β dans les cellules nullizygotés restaure la lignée oligodendrocytaire, déficiente chez les souris mutantes (*figure 6, manuscrit en préparation*). Une étude fonctionnelle des lignées exprimant les différentes formes exogènes mutantes a confirmé l'implication de CK2 β dans la prolifération et/ou la différenciation des cellules neurales (*figure 6, manuscrit en préparation*).

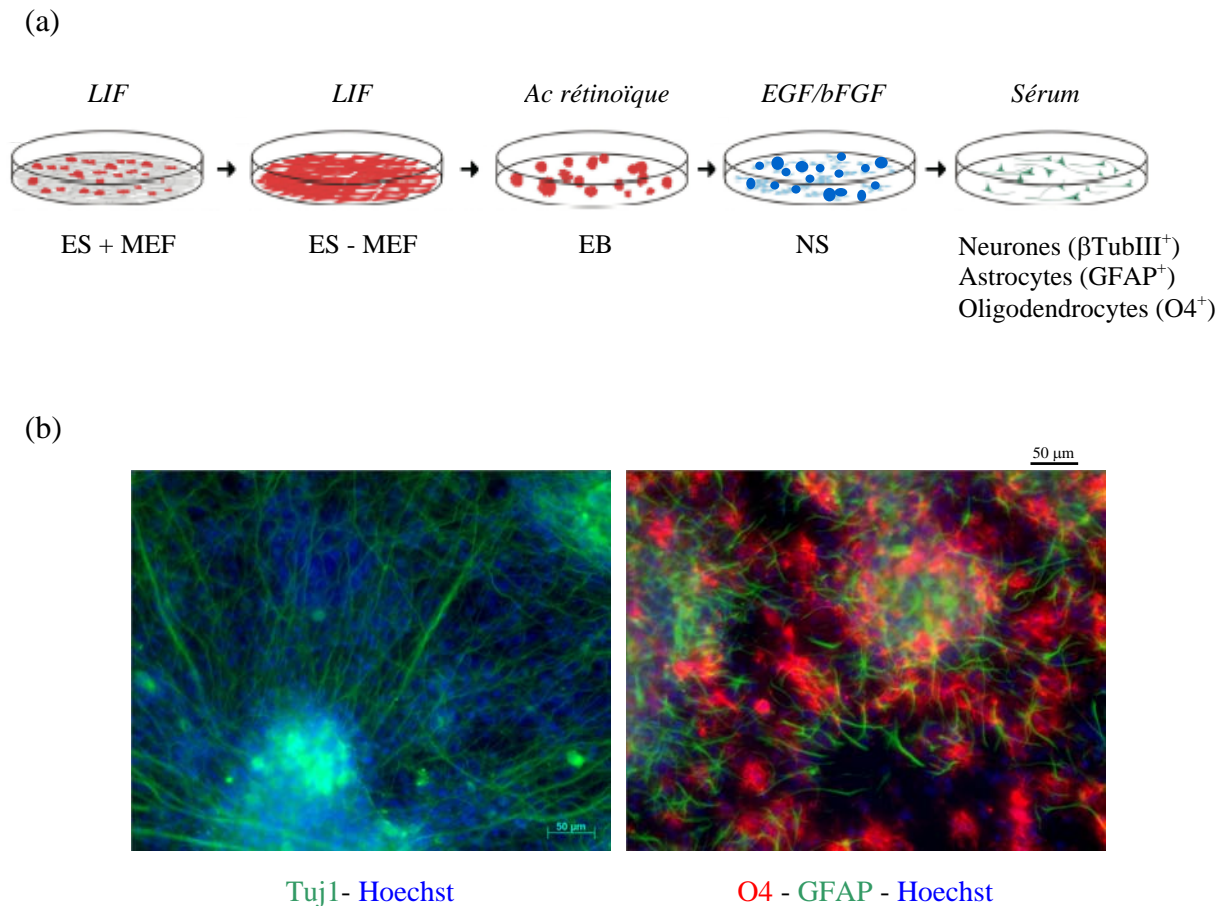


Figure 38 : Différenciation des cellules ES en cellules neurales.

(a) Les cellules ES sont cultivées en présence de cellules nourricières (MEF : *Murin Embryonic Fibroblasts*) qu'il faut éliminer. Après génération des corps embryoïdes (EB), cultivés 4 jours sans facteur de différenciation, puis 4 jours en présence d'acide rétinolique, les cellules sont individualisées et réensemencées dans de nouvelles conditions de culture afin d'obtenir des neurosphères (NS). Les neurosphères sont ensuiteensemencées sur poly-L-lysine en présence de sérum afin d'induire leur différenciation en cellules des 3 lignages neurales majoritaires du système nerveux central (voir matériel & méthodes).

β TubIII : β -tubuline III ; GFAP : *glial fibrillary acidic protein* ; O4 : marqueur de surface des oligodendrocytes.

(b) Analyses par immunocytochimie des neurosphères différenciées issues des cellules souches embryonnaires parentales (ES $CK2\beta^{lox/-}$).

Article en préparation :

CK2 β gene function is essential during brain development for the maintenance of neural stem cell and the oligodendroglial differentiation.

Ziercher L, Blond O, Raponi E, Balenci L, Deloulme JC, Filhol O, Baudier J, Boldyreff B, Cochet C, Buchou T.

(33 pages de texte, 9 de figures)

Les résultats de l'étude fonctionnelle dans le modèle d'invalidation conditionnelle et restauration de la viabilité des cellules souches embryonnaires CK2 β ^{-/-} sont résumés par la figure 6 de l'article.

***CK2 β* gene function is essential during brain development for the maintenance of neural stem cell and the oligodendroglial differentiation**

Léa Ziercher^{1,2}, Olivier Blond^{1,2}, Eric Raponi¹, Laurent Balenci¹, Jean-Christophe Deloulme¹, Odile Filhol¹, Jacques Baudier¹, Brigitte Boldyreff³, Claude Cochet¹ and Thierry Buchou^{1*}

¹ INSERM EMI0104, DRDC/TS, CEA Grenoble, Grenoble, France.

³ Kinase Detect, Odense, Denmark.

Subdivision: Neurosciences

***Correspondence:** INSERM EMI0104, DRDC/TS, CEA Grenoble,
17, Av. des Martyrs, F-38054, Grenoble, France.
Tel.: +33438784046; Fax: +33438785058
E-mail: thierry.buchou@cea.fr

² L Z and O B contributed equally to this work

Keywords: protein kinase CK2, conditional knockout mice, neural progenitor, oligodendrogenesis, embryonic stem cell

Running title: CK2 β and NSC capacities

Summary

Genetic programs that govern neural stem cell proliferation and differentiation are dependent of extracellular cues and a network of nuclear transcription factors. However, little is known about kinases regulating these processes. We show that in the brain, CK2 β , the regulatory subunit of protein kinase CK2, is required for proliferation of embryonic neural stem cells (NSCs). Furthermore, we establish that CK2 β is indispensable for self-renewal but not for the generation of multipotent FGF2-/EGF-dependent NSCs. In addition to the role of CK2 β in stem cell maintenance, the absence of CK2 β signalling perturbs the normal balance of differentiation capacity of NCSs: CK2 β controls telencephalic oligodendrogenesis during embryonic development, whereas global neurogenesis and astrocytogenesis are not affected in CK2 β mutant. CK2 β is a strict positive regulator for the lineage progression of fate committed progenitors to oligodendrocyte precursor cells (OPCs) both *in vitro* and *in vivo*. We propose that nuclear transcription factors, such as Mash1 and Olig2 whose CK2 phosphorylations are CK2 β -dependent, may play a role in CK2-mediated regulation of oligodendrogenesis. We also demonstrate that specific domains of CK2 β involved in the regulatory function towards CK2 catalytic subunits are crucial structural determinants for both proliferation and oligodendrocyte lineage progression of embryonic stem cells. Collectively, these results show for the first time that in contrast to the essential function in cell viability initially detected in embryonic stem (ES) cells, the regulatory subunit (β) of protein kinase CK2 plays a unique role in neural development.

Introduction

Protein kinase CK2 (CK2) is a highly conserved serine/threonine kinase with more than 300 substrates to date - mostly proteins related to transcription and transcription-directed signalling - (Pinna, 2002). The canonical view of CK2 lies in the structure of a tetrameric holoenzyme composed of two catalytic subunits, α and α' , which bridges with a dimeric building block of regulatory β subunits to form $\alpha\alpha'\beta_2$, $\alpha_2\beta_2$ or $\alpha'_2\beta_2$ heterotetramer. The regulatory β subunit (CK2 β) is a unique protein encoded by a single gene in mammals and does not share similarity with any known protein. Depending on the substrate, CK2 β either activates or inhibits the enzymatic activity of CK2 (Meggio *et al.*, 1992). High resolution structures of the isolated CK2 β subunit and of the holoenzyme complex indicate that CK2 β dimerization is mediated by a zinc finger motif. They also suggest that the molecular architecture of CK2 β is consistent with its dynamic role as a docking partner for other protein kinases and other interacting partners in the cell (Chantalat *et al.*, 1999; Niefind *et al.*, 2001). Different conserved structural motifs described at the CK2 β surface are thought to be involved in such interactions and suspected of regulatory functions (Bibby and Litchfield, 2005). Besides, live-cell fluorescence imaging studies confirm the independent dynamic of individual CK2 subunits (Filhol *et al.*, 2003). Functional and biochemical studies described modulation of several other serine/threonine kinases such as A-raf (Hagemann *et al.*, 1997), c-mos (Chen *et al.*, 1997) and Chk1 (Guerra *et al.*, 2003) through the interaction with CK2 β . In the mouse brain expressions of the three CK2 subunits (α , α' , and β), as detected by *in situ* hybridization, were largely distributed in most nerve cells (A. Kolding and B. Boldyreff, unpublished data). Moreover, in extracts of mouse brain, CK2 β fractions devoid of CK2 catalytic subunits, but probably involved in complex with other proteins, have been described (Guerra *et al.*, 1999). The existence of CK2 β protein free of CK2 catalytic subunits, and the fact that the ratio of CK2 β /CK2 α + α' in this tissue is high when compared to others organs (Xu *et al.*, 1999; Guerra *et al.*, 1999), suggest independent functions for CK2 subunits. Altogether, these observations suggest multiple regulatory functions of CK2 β in several signalling pathways.

The “*in vivo*” role of CK2 β has been approached by genetic studies. In *Saccharomyces cerevisiae* deletions of either one or both *CKB1* and *CKB2* genes have no effect on the viability and growth in normal media, suggesting that constitutive activity of the catalytic subunits is sufficient to maintain survival (Bidway *et al.*, 1995; Reed *et al.*, 1995; Glover, 1998). However, deletion of *CKB2* causes a partial block in the adaptation to the G2/M checkpoint arrest induced by DNA damage (Toczyski *et al.*, 1997). In *Schizosaccharomyces pombe*, CK2 β plays a more stringent function by regulating growth and cell shape (Roussou and Draetta, 1994). In contrast, in higher eukaryotes CK2 β loss of function results in lethality (Fraser *et al.*, 2000; Jauch *et al.*, 2002; Buchou *et al.*, 2003). In mice, we previously demonstrated that disruption of CK2 β leads to growth retardation of E6.5 embryos with minimal sign of apoptosis and results in post implantation lethality. Moreover, attempts to generate CK2 β ^{-/-} embryonic stem cells by classical and conditional knockout and by morula development *in vitro* failed, suggesting that the essential role of mammalian CK2 β for viability at the cellular level has been acquired during evolution. The function of CK2 β for cell cycle progression has been investigated, but its precise role is largely unknown. Cell proliferation function of CK2 β has been first described in human fibroblast using antisense oligodeoxynucleotides and microinjection of specific antibodies (Pepperkok *et al.*, 1991; Lorenz *et al.*, 1993). Recently, a genome-wide survey of protein kinases required for cell

progression into cultured *Drosophila* S2 cells by double-stranded RNA demonstrates that CK2 β is required for centrosomal normality and consequently for mitosis (Bettencourt-Dias *et al.*, 2004).

By a genetic screen for mutation affecting the central brain of *Drosophila*, Jauch *et al.* have isolated a hypomorphic allele of *DmCK2 β* , *mushroom bodies undersized*, suggesting a role of CK2 β in cell proliferation or cell survival during brain development (Jauch *et al.*, 2002). Independently, a *Drosophila* circadian mutant *Andante* isolated from an ethyl-methanesulfonate mutagenic screen has been described to be also a hypomorphic mutation in the gene encoding CK2 β (Akten *et al.*, 2003). CK2 β mutant flies show abnormally long circadian period. This phenotype is linked to the accumulation of the clock transcription repressors Period (Per) and Timeless (Tim) in mutant clock neurons and a delay in the nuclear translocation of Per and Tim, suggesting a defect in targeted degradation. Interestingly, Lin *et al.* isolated from an identical screen a dominant mutant, *Timekeeper*, which has been identified as a CK2 α mutant gene resulting in reduced enzymatic activity (Lin *et al.*, 2002). Previous studies have shown that CK2 phosphorylates Per and Tim *in vitro* (Zeng *et al.*, 1996). These results suggest that CK2 β -dependent phosphorylation of transcription factors modulates their cellular localization and/or degradation and that CK2 β may have mammalian brain functions both in proliferation and differentiation.

In mouse, radial glia, which reside initially in the ventricular zone (VZ) of the developing brain, is the neonatal origin of adult neural stem cells and generates self-renewing, multipotent neurospheres. Recently, maternal embryonic leucine zipper kinase has been shown to control the proliferation of multipotent neural stem cells (Nakano *et al.*, 2005). Furthermore, radial glia gives rise to neurons, astrocytes and oligodendrocytes *in vivo* (Merkle *et al.*, 2004). During embryogenesis, radial glia function as neuronal progenitors in all central nervous system (CNS) structures with a spatiotemporal pattern (Anthony *et al.*, 2004). Glial cells, astrocytes and oligodendrocytes, are generated subsequent to neurogenesis. Oligodendrocytes originate from neural progenitors in the ventricular zone (VZ), and once committed, they migrate as proliferative precursors (OPCs) in all regions of the CNS where they terminally differentiate (reviewed in Rowitch, 2004). Distinct genetic programs using combinatorial code of nuclear transcription factors governs multiple spatiotemporal origins of oligodendroglial specification (Spassky *et al.*, 2001; Chandran *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2005; Fogarty *et al.*, 2005; Vallstedt *et al.*, 2005; Kessarlis *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2006). Oligodendrogenesis is regulated by a complex network of homeodomain (HD)-transcription factors Nkx2.2, Nkx6.1 and Nkx6.2 (Zhou *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2005; Vallstedt *et al.*, 2005), of high-mobility-group factors Sox10, Sox9, Sox8 (reviewed in Wegner and Stolt, 2005), and of basic-helix-loop-helix (bHLH) proteins Olig1, Olig2 and Mash1 (Lu *et al.*, 2002; Takebayashi *et al.*, 2002; Zhou and Anderson, 2002; Parras *et al.*, 2004). Among Olig family, Olig2 plays a predominant role in the embryonic specification of oligodendrocyte lineages whereas Olig1 is more generally required for maturation of oligodendrocytes and in the adult brain to repair demyelinating lesions (Lu *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2002; Takebayashi *et al.*, 2002; Arnett *et al.*, 2004; Xin *et al.*, 2005). Olig2^{-/-} cells are in fact converted into astrocytes (Takebayashi *et al.*, 2002; Zhou and Anderson, 2002). However, protein kinase-mediated signalling pathways which control functions of transcription factors involved in neural development are largely undiscovered. Recently, ciliary neurotrophic factor-induced astrocyte differentiation in mouse embryonic telencephalic neural progenitors has been correlated with AKT-dependent phosphorylation of Olig2 that stimulates its export from the nucleus to the cytoplasm (Setoguchi and Kondo, 2004). bHLH transcription factors have been already described to be phosphorylated and regulated by CK2. The CK2 phosphorylation of

Hairy/Enhancer of split (Hes) 6 on Ser 183 promotes neurogenic ability of mouse embryonic telencephalic neural progenitors by repressing the Hes1-mediated transcriptional inhibition (Gratton *et al.*, 2003). In addition, E47-dependent CK2 phosphorylation of Mash1 on Ser152 increases its protein stability and assigns CK2 as a positive regulator of Mash1 transcriptional activity in neural development. Interestingly, knock down expression by RNA interference of the CK2 β subunit induces reduction of the steady-state levels of Mash1, suggesting a CK2 β -dependent function on neural development through CK2 β -dependent phosphorylation and stability of Mash1 (Viñals *et al.*, 2004).

To explore regulatory functions of CK2 β in brain development, we have used Cre/Lox-mediated recombination to generate mice with a *CK2 β* null allele in the progenitors of neurons and glia, leading to a complete absence of the CK2 β protein in the central nervous system. Here we provide, from both *in vivo* and *in vitro* studies, genetic evidence of CK2 β unexpected neural functions. Lack of CK2 β affects proliferation and self-renewal, but not the generation of telencephalic neural stem cells (NSCs). Whereas neurogenesis and astrogenesis are not affected in mutant FGF2-, EGF-, and PDGF-AA-dependent NSCs, CK2 β is also absolutely required for the oligodendrocyte lineage progression step which transforms committed progenitors to OPCs both *in vitro* and *in vivo*. In parallel, we show in mutant neurosphere assays a decrease in Mash1⁺ precursors, an absence of nuclear Olig2⁺ progenitors, and reveal Olig2 as a CK2 β -dependent substrate. Thus, *CK2 β* gene function represents a central and non redundant signalling component that dictates an oligodendroglial specification. Analysis of mutation in different structural domains of CK2 β in conditional *CK2 β* knockout embryonic stem (ES) cells suggests that specific modulation of CK2 activity is required for NCS proliferation and oligodendroglial capacities.

Results

CK2 β ablation in the nervous system shows defects in late forebrain development

To gain insight into functions of CK2 β in the developing central nervous system (CNS), CK2 β had to be ablated in a tissue-specific manner, as homozygous loss of CK2 β is lethal in mice (Buchou *et al.*, 2003). We crossed hemizygous nestin-Cre transgenic mice (Tronche *et al.*, 1999) with CK2 $\beta^{2lox/2lox}$ mice to produce CK2 $\beta^{2lox/wt}$ and plus nestin-Cre mice (referred as CK2 $\beta^{2lox/wt(+)}$). Nestin-Cre transgene specific expression in embryonic neural progenitors as early as E9.5-E10.5 and in their neuronal and glial derivatives has been verified (Graus-Porta *et al.*, 2001). CK2 $\beta^{2lox/wt(+)}$ mice were then crossed once more with CK2 $\beta^{2lox/2lox}$ animals, producing the four genotypes used, CK2 $\beta^{2lox/wt(-)}$, CK2 $\beta^{2lox/wt(+)}$, CK2 $\beta^{2lox/2lox(-)}$, and CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$. Because mutant CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mice were born, did not feed and died shortly after birth (P0), the phenotype of embryos was analyzed at E18.5. The ratio of mutant CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ E18.5 embryos produced was Mendelian, as detected by tail-DNA PCR (Fig. 1A). (The phenotypes observed for CK2 $\beta^{2lox/wt(-)}$, CK2 $\beta^{2lox/wt(+)}$, and CK2 $\beta^{2lox/2lox(-)}$ E18.5 embryos in this work were identical and referred as wild type). Gross morphology appeared similar between wild type and mutant dissected brains. Histological analyses of mutant brains showed major defects in the telencephalon (Fig. 1B). Absence of the hippocampal dentate gyrus (DG), enlargement of lateral ventricles, and absence at the corpus callosum level of cells that formed linear pearls-on-a string arrays characteristic of oligodendrocytes (Stolt *et al.*, 2002) were evident in CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant forebrains. In contrast, laminar patterns and cellular density were not different in the cortex, suggesting that neurogenesis occurred normally in mutants. This was confirmed after analyses by Western blot of similar expression levels of the neuron specific class III β -tubulin protein in mutant and wild type telencephalon extracts (Fig. 1D).

To confirm that the CK2 β gene was inactivated in the telencephalon of the mutant E18.5 embryos, we monitored recombination of CK2 β^{2lox} allele in favour CK2 β^{-} allele at the telencephalon-DNA level and CK2 β expression at the protein level. Recombination in neural tissue was detectable at the DNA level (Fig. 1C). The CK2 β protein was essentially absent in extracts from dissected telencephalons from mutant embryos at E18.5 (Fig. 1D), and only low levels could be revealed upon long exposure of the films (data not shown). This was expected, since CK2 β is expressed in blood vessels, where Cre was not active (Graus-Porta *et al.*, 2001), contaminated dissected telencephalons. In contrast, the CK2 β protein was detected in extracts from dissected telencephalons from mutant embryos at E16 (Fig. 1E), whereas Cre is already active at E9.5-10.5. This observation is in agreement with the stability of the CK2 β protein involved in the molecular structure of CK2 α_2 and/or $\alpha'_2\beta_2$ holoenzymes (Luscher and Litchfield, 1994) and could explain related phenotypes. Importantly, CK2 α catalytic subunit expression was unchanged upon CK2 β ablation in extracts of dissected telencephalons from mutant embryos at E18.5 (Fig. 1D). Identical results were also obtained for CK2 α' catalytic subunit expression by using specific antibodies (Guerra *et al.*, 1999; data not shown). We also measured CK2 activity in extracts from telencephalons at E18.5 using the CK2 β -dependent phosphorylation of the peptide RRREEETEE (Homma *et al.*, 2002). In line with ablation of CK2 β in mutant telencephalon, CK2 β -dependent CK2 activity decreased in mutant extracts (71 +/- 11 units in controls, and only 32 +/- 7 units in CK2 β mutants; Fig. 1F). The remaining

activity in mutant extracts could be related to holoenzyme molecules derived from blood vessel cells present in dissected telencephalons (see above). We conclude that expression of CK2 β and, thus the activity of CK2 β -dependent phosphorylation is effectively abolished in telencephalon at E18.5.

CK2 β loss compromises embryonic forebrain stem cell proliferation and self-renewal

Previous results indicate that during mouse embryogenesis CK2 β is mainly involved in proliferation rather than in the prevention of apoptosis (Buchou *et al.*, 2003). The abnormal development of the hippocampal DG in the telencephalon of mutant E18.5 embryos prompted us to analyse the SDF-1/CXCR4 chemokine signaling system that controls the migratory stream of dividing DG progenitor cells at this stage (Lu *et al.*, 2002). Ki67-labelling of forebrain sections revealed that the migratory stream of dividing DG progenitor cells is distinct in the wild type but almost undetectable in the mutant at E18.5 (Fig. 2A). We next examined BrdU incorporation, after a short pulse, in the germinal ventricular zone (VZ) of E18.5 telencephalon lateral ventricles. The CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant VZ displayed a significant reduction in the percentage of neural stem cells (NSCs) in S phase as determined by the extent of BrdU-labelled nuclei (28.9 +/- 4.6 % of BrdU-labelled cells in controls, and only 11.4 +/- 4.7 % in CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutants; Fig. 2A, 2B). BrdU⁺ null NSCs exhibited also altered nuclear morphology. To further examine the effects of loss of CK2 β on the cell cycle, sections were stained with an antibody against phospho-histone H3 (ser10), a mitotic marker. Very few CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant NSCs (Fig. 2A) were phospho-histone H3 (ser10) positive (PH3 mitotic).

Because reduced number of NSCs could be the result of slow cell cycle and also of an increase in cell death, TUNEL staining was performed on E18.5 sections of control and CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ null embryos (Fig. 2A). Apoptotic cells were almost undetectable in the VZ of control mice. Loss of CK2 β caused a light increase in the level of apoptosis. Apoptotic cells were not restricted to the VZ and were detected also outside the germinal zones, including cortical layers (data not shown). Since gross morphology and cellular density were not dramatically reduced in mutant brains, the enhanced cell death observed after CK2 β loss should slightly account as the primary mechanism responsible for the reduced number of NSCs in mutant embryos. In line of this assumption, cleaved PARP, a hallmark of caspase-3-dependent apoptosis *in vivo*, was undetectable in mutant telencephalons (Fig.3C).

Embryonic NSCs located in the telencephalic VZ or in the ventral forebrain have been identified by their ability, *in vitro*, to generate floating aggregates of proliferating cells in response to FGF2 and EGF stimulation, termed neurospheres (Tropepe *et al.*, 1999). To gain further insight into the role of CK2 β in the proliferation of embryonic NSCs, we used this neurosphere assay to further characterized NSCs isolated from individual E18.5 mutant or wt embryos. There was no significant difference between wt and mutant embryos in the number of primary neurospheres generated from respective telencephalons in response to FGF2+EGF in cultures at day 4 (Fig. 2E). This argues and confirms that cell death was not the principal mechanism responsible for reduced number of NSCs and indicates that mutant NSCs had intact EGF- and/or FGF2-dependent intracellular signaling pathways. Whereas wt cells formed large neurospheres, as observed in cultures at day 7, mutant neurospheres, in contrast, did not grow (Fig. 2D). This was reflected by the reduction in cell numbers obtained from dissociated mutant neurospheres after FGF2+EGF treatment (20.5 +/- 0.4 x10⁵ dissociated cells per individual wt telencephalon-derived neurospheres, and only 1 +/- 0.3 x 10⁵

dissociated cells per mutant telencephalon-derived neurospheres; Fig. 2F). The frequency of secondary neurosphere formation corresponds to the self-renewing potency of the NSCs grown in the primary neurospheres (Nakamura *et al.*, 2000). Mutant NSCs grown in primary neurospheres almost lost their self renewing capacity, and consequently only few degenerating mutant secondary neurospheres were observed in this assay (Fig. 2D). These intrinsic parameters of mutant NSCs, weak proliferation and self renewal capacities, did not allow to perform such neurosphere assays under clonal condition (for example, plating a single cell per miniwell).

These results indicate that, both *in vivo* and *in vitro*, CK2 β is a positive regulator of NSCs proliferation and self-renewal.

CK2 β is essential for embryonic forebrain stem cell oligodendroglial potential in vitro

Neurosphere cells are multipotent, and can be induced to differentiation in the absence of the growth factors FGF2/EGF. They generate neurons, astrocytes, and oligodendrocytes, the three major cell types of the CNS (Nakamura *et al.*, 2000). We first analyzed the neural characteristics of CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant embryonic telencephalic NSCs derived from neurospheres and cultured on plates that were precoated with poly-D-lysine in the presence of mitogens. After one hour, these cells were immunostained with anti-Nestin (a neural undifferentiated progenitor marker; Anthony *et al.*, 2004) antibody. Wild type cells (>90%) were labelled by the Nestin antibody (Fig 3Aa). CK2 β deficient cells did not fail to express the progenitor marker. These results clearly demonstrate that cells in floating spheres derived from E18.5 telencephalon CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant are true NSCs.

We next analyzed Mash1 expression in CK2 β deficient NSCs. The (bHLH) transcription factor Mash1 is required for the generation of neuronal and oligodendrocytes progenitors in embryonic and adult rostral telencephalon (Parras *et al.*, 2004). It has been also suggested that Mash1 is a CK2 β -dependent substrate, whose phosphorylation regulates the stability of Mash1 (Viñals *et al.*, 2004). Indeed, the percentage of Mash1⁺ (high level of nuclear expression) cells was reduced in CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant neurospheres (19.6 +/- 6.0 % of Mash1-labelled cells in CK2 β^{wt} , and only 7.6 +/- 3.4 % in CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant neurospheres; Fig. 3Ab, B). This reduction was confirmed *in vivo* by western blot analysis (Fig. 3C). However, immunohistochemistry analysis of E18.5 telencephalon revealed that Mash1 progenitors are correctly located in rostral and ventral positions in mutant brains (Fig. 3Ac).

To address whether loss of CK2 β affects not only stem cell maintenance but also the lineage determination of NCSs, we induce differentiation *in vitro* from neurosphere cultures at day 4. Surprisingly, CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant neurospheres formed β III-tubulin⁺ neurons and GFAP⁺ astrocytes, but failed completely to generated O4⁺ pre oligodendrocytes after 3 days of differentiation cultures (Fig. 3D, 3F). These results were obtained whether neurospheres have been generated independently in response to FGF2, EGF, PDGF-AA, or EGF+FGF2 in combination, and when differentiation cultures have been prolonged for 11 days. These results suggest that the absence of O4⁺ pre oligodendrocytes is not due to defects in signalling pathways that instruct NSCs for particular differentiation capacities (Chandran *et al.*, 2003; Gabay *et al.*, 2003; Chojnacki and Weiss, 2004; Sun *et al.*, 2005) or a delay in the progression of the oligodendrocyte lineage, but rather to an intrinsic property of CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant NSCs. Since oligodendrocyte lineage progresses in multiple steps, we also examined NG2 and PDGFR α expression as established oligodendrocytes precursor cells (OPCs) markers

(Nishiyama *et al.*, 1996; Hall *et al.*, 1996). After 3 days of differentiation cultures, we detected NG2⁺ and PDGFR α ⁺ cells extending several processes suggestive of OPCs in experiments performed with wild type neurospheres (Fig. 3E; see also 4G). OPCs derived neurospheres co expressed NG2 and PDGFR α markers (data not shown). In striking contrast, CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant neurospheres did not generate OPCs.

We hypothesized that Mash1 reduction in CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutants can not completely explain the absence of the oligodendrocyte lineage. Indeed, *Mash1*^{-/-} null neurosphere cells are still able to generate O4⁺ pre oligodendrocytes, albeit the production is diminished, suggesting Mash1-independent oligodendrogenesis (Parras *et al.*, 2004). In the CNS, the high-mobility-group Sox 10 and (bHLH) Olig2 transcription factor expressions appear to be a hallmark of progenitor commitment into the oligodendrocyte lineage and precedes PDGFR α OPCs expression (Stolt *et al.*, 2002). Moreover, NG2⁺ OPCs development depends on *Olig2* function (Ligon *et al.*, 2006) and *Olig2* is the principal *Olig* gene for oligodendrocyte development (Lu *et al.*, 2002; Takebayashi *et al.*, 2002). Nkx2.2, a homeodomain transcription factor and a positive modulator of oligodendrocyte differentiation, is also expressed in progenitors (Zhou *et al.*, 2001; Arnett *et al.*, 2004). Therefore, we searched for the detection of Sox10⁺, Nkx2.2⁺ and Olig2⁺ cells in differentiation neurosphere cultures. Quantification analysis revealed an identical percentage of nuclear Sox10⁺ cells derived from CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant neurosphere cultures induced for differentiation during 3 days when compared to CK2 β ^{wt} counterparts (11.0 +/- 2.1 % of Sox10-labelled cells in CK2 β ^{wt}, and 10.8 +/- 3.4 % in CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant differentiation cultures), suggesting adequate commitment of CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant NCSs into the oligodendrocyte lineage. In wild type differentiation neurosphere cultures, Sox 10 was also expressed in more mature O4⁺ pre oligodendrocytes (Fig.4A). Moreover, nuclear Nkx2.2 expression was also detected in cells derived from CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant differentiation neurosphere cultures (Fig.4B). In contrast, nuclear Olig2⁺ cells were absent in mutant differentiation neurosphere cultures (Fig. 4C; see also Fig. 4E). It has been demonstrated that functional nuclear Olig2 is absolutely required for oligodendrocyte lineage specification and that inhibition generates a switch in glial fate in favour of astrocytogenesis (Zhou and Anderson, 2002; Takebayashi *et al.*, 2002; Muroyama *et al.*, 20005; Buffo *et al.*, 2005). Besides, nuclear export of Olig2 in NSCs, promoted by AKT-dependent phosphorylation, is essential for CNTF-induced astrocyte differentiation (Setoguchi and Kondo, 2004) and nuclear Olig2 inhibits the promoter of astrocyte-specific *GFAP* gene (Fukuda *et al.*, 2004). In agreement with these observations, nuclear Olig2⁺ cells in CK2 β ^{wt} neurosphere differentiation cultures did not co-express GFAP (an intermediate filament protein and a major structural component of astrocytes; Fig. 4C). We also did detect Olig2 expression in some CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant cells, but its localization was found in the cytoplasm (Fig. 4C, 4E). Interestingly, conditional knockout of CK2 β in the CNS resulted in an increase of GFAP⁺ astrocytes generated from differentiation neurosphere cultures (12.8 +/- 5 % of GFAP-labelled cells in CK2 β ^{wt}, and 32.8 +/- 10 % in CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant differentiation cultures; Fig. 3F). By Western blotting analysis of CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant telencephalon extracts in comparison with their CK2 β ^{wt} counterparts, we excluded the possibility that an *in vivo* increased AKT activity in CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant was responsible for the absence of nuclear Olig2⁺ cells (Fig. 4D). It should be noted that the second member of the (bHLH) Olig transcription factor family involved in repair of demyelinated lesions but not in oligodendrocyte lineage development, Olig1, is completely cytoplasmic in O4⁺ pre oligodendrocytes derived from CK2 β ^{wt} neurosphere differentiation cultures (Fig.4E), a situation found in adult mouse brain (Arnett *et al.*, 2004). Cytoplasmic Olig1⁺ cells were also

detected in $CK2\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant differentiation neurosphere cultures, but in cells with astrocyte-like morphology (Fig. 4E). Altogether, these results suggested early commitment of $CK2\beta^{2lox/2lox(+)}$ NCSs into the oligodendroglial fate, but failure in progression into the lineage. We further asked whether using differentiation neurosphere conditions that can influence the fate choice of multipotent NCSs in favour to an oligodendrocyte lineage would reverse the $CK2\beta^{2lox/2lox(+)}$ phenotype. In parallel experiments, we induced differentiation of NSCs with 3.5% FCS or 500ng/ml insulin-like growth factor I (IGF-I), a molecule that instructs NCS to become oligodendrocytes (Hsieh *et al.*, 2004). After 3days of differentiation neurosphere cultures in the presence of IGF-I, $CK2\beta^{wt}$ -derived $O4^+$ pre oligodendrocytes possessed complex processes in comparison to the FCS condition (Fig. 4F; see also Fig. 4H), suggesting a more mature stage. IGF-I restored the generation of nuclear Olig2 $^+$ cells in mutant $CK2\beta^{2lox/2lox(+)}$ differentiation neurosphere cultures; however, $O4^+$ pre oligodendrocyte were still not detected (Fig.4F). From these observations, we concluded that nuclear localization of Olig2 is absolutely required, but not sufficient to generate mature oligodendrocyte. In the presence of IGF-1, Olig1 localization remained cytoplasmic (Fig.4G). In spite of the absence of $O4^+$ cells after IGF-I treatment, we did detect rare IGF-I induced NG2 $^+$ OPCs from $CK2\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant neurospheres (Fig.4H). In the presence of FCS or IGF-I, nearly all $CK2\beta^{wt}$ neurospheres generated NG2 $^+$ OPCs. As already described (this manuscript), none NG2 $^+$ OPC were obtained from FCS-treated $CK2\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant neurospheres. Over 1537 neurospheres observed (from five independent $CK2\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant telencephalic embryo cultures), only 13 IGF-I treated $CK2\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant neurospheres generated NG2 $^+$ OPCs, suggesting that the IGF-I signalling pathway can remain functional in the mutant context. Hence, $CK2\beta$ loss of function prevents NCSs to generate OPC *in vitro*.

CK2 β deficiency affects the generation of OPCs in E18.5 telencephalon

To examine whether $CK2\beta$ regulates NSCs oligodendroglial capacity *in vivo*, we assessed the expression of OPCs and progenitors markers by immunohistochemistry analysis of E18.5 telencephalon. Parenchymal NG2 $^+$ cells with OPCs morphology were completely absent in $CK2\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant telencephalons, and only NG2 $^+$ pericytes associated with blood vessels were detected (Fig.5A). NG2 $^+$ OPCs deficiency was also observed in all subregions of the telencephalon examined (corpus callosum, dorsal neocortex, ventral forebrain, hippocampus, and fimbria). In contrast, nuclear Olig2 $^+$ and Sox10 $^+$ progenitors were present in $CK2\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant telencephalons (Fig. 5B, 5D; respectively). However, $CK2\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant nuclear Olig2 $^+$ cells were mainly found in the VZ with a deficiency of parenchymal migrating Olig2 $^+$ cells. This observation is reminiscent with a defect of progenitors in the capacity to generate OPCs (Ligon *et al.*, 2006) or with a lack in the migration capacity of progenitors. Since, absence of OPC were also observed in $CK2\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant differentiation neurosphere cultures obtained after cell dissociation of mutant telencephalon (see above), we favoured cell autonomous progenitor defect. Occasionally, in $CK2\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant cells, Olig2 expression was detected in the cytoplasm (Fig. 5C). Altogether, these data confirm a $CK2\beta$ genetic regulation of the NSC oligodendroglial capacity *in vivo* and concurs with the defect of oligodendrocyte illustrated in the corpus callosum (Fig. 1B).

Rescue of viability and oligodendrogenesis by CK2 β exogenous expression into CK2 β ^{-/-} ES cells

Because we could not clone and amplify CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant NCSs due to their defects in proliferation and stem cell self-renewal, and to further investigate the genetic requirement of CK2 β in developmental capacity, we used our conditional knockout CK2 β ^{2lox/-} embryonic stem (ES) cell system. We first stably expressed HA-tagged CK2 β ^{wt/Neo^R} into CK2 β ^{2lox/-} ES cells after retroviral infection (Fig. 6B), and used both uninfected CK2 β ^{2lox/-} and CK2 β ^{2lox/wt} ES cells for negative and positive controls, respectively. Upon secondary retroviral infection, Cre/Puro^R was transiently expressed for 6, 9 days in the different ES cell lines (Fig. 6 A). As already published (Buchou *et al.*, 2003), CK2 β lack was deleterious for ES cells. HA-tagged CK2 β ^{wt/Neo^R/Puro^R} ES clones were screened for the recombination event and consequently for the absence of the CK2 β ^{2lox} and the only presence of the CK2 β alleles by PCR and Southern blot analysis (data not shown). Selected HA-tagged CK2 β ^{wt/Neo^R/Puro^R} CK2 β ^{-/-} ES clones were analyzed by Western blot to confirm the absence of the endogenous CK2 β protein (Fig. 6B). Concomitant with viability rescue, we noted effective production of O4⁺ pre oligodendrocytes in differentiation experiments performed with HA-tagged CK2 β ^{wt/Neo^R/Puro^R} CK2 β ^{-/-} ES cells (Fig. 6C). These findings show that exogenous HA-CK2 β ^{wt} activity is critical for ES cell viability and O4 oligodendrogenesis.

We next asked whether CK2 β function acts through the modulation of catalytic CK2 activity or by interference with putative interacting partners, as suggested by Bibby and Litchfield (Bibby and Litchfield, 2005). We then succeeded to rescue the viability of nullizygous CK2 β ^{-/-} ES cells by exogenous expression of different mutant CK2 β proteins: 1) a $\Delta 2$ form, deleted of the two last C-terminal amino acids, found in tumor extracts, and whose biochemical properties do not differ from the CK2 β ^{wt} protein (Filhol O., personal communication); 2) a polyamine binding domain mutant CK2 β ^{Glu 60, 61, 63 Ala} that generate a CK2 hyperactive tetrameric holoenzyme (CK2 α ² β ^{Glu 60, 61, 63 Ala 2}; Leroy *et al.*, 1997); 3) a mutant in the CK2 β -CK2 β interface CK2 β ^{Pro 110 Asp} fully competent to interact with the catalytic subunits of CK2 to form the canonical multi subunit holoenzyme, but with decrease potential to confer CK2 β -dependent phosphorylation specificity (Filhol *et al.*, 2004). The ES cell viability rescue obtained with the CK2 β ^{Pro 110 Asp} mutant can be explained by the fact that minimal CK2 β -dependent CK2 activity is sufficient for survival signals (Blond *et al.*, 2005). Nullizygous CK2 β ^{-/-} ES cells expressing exogenous CK2 β ^{$\Delta 2$} and CK2 β ^{Glu 60, 61, 63 Ala} mutant proteins behaved as wild type counterparts. In contrast, CK2 β ^{Pro 110 Asp} rescued ES cells were significantly deficient in the frequency to generate embryoid bodies (EBs) in the absence of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and thereafter to form neurospheres in the presence of FGF2+EGF (Fig. 6D, F). These results are not in agreement with the absence of a neurosphere frequency phenotype observed with CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant E18.5 telencephalic NCSs (Fig. 2E). Therefore, our ES differentiation protocol did not recapitulate totally the *in vivo* generation of telencephalic NCSs. However, the ~ 50% decrease in cell numbers detected in EB and neurosphere assays (Fig. 6E, G) for CK2 β ^{Pro 110 Asp} rescued ES cells could parallel the proliferation defect described for CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant NSCs (Fig. 2F). Whereas CK2 β ^{$\Delta 2$} and CK2 β ^{Glu 60, 61, 63 Ala} rescued ES cells produced O4⁺ pre oligodendrocytes (data not shown), repeated attempts to analyse differentiation potential of CK2 β ^{Pro 110 Asp} neurospheres failed essentially due to an attachment defect onto poly-L-lysine-treated glass coverslips. Collectively, these data suggest that CK2 β neural functions act towards a positive regulation of the CK2 α catalytic subunit activity.

Mouse Olig2 is an interacting partner of CK2 subunits, but is a strict CK2 β -dependent substrate

Olig2 gene function plays critical roles for NG2 OPC specification in the forebrain (Ligon *et al.*, 2006) and *CK2 β* loss of function leads to a defect in the lineage progression of fate committed progenitor to OPC both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, regulation of *Olig2* function has been also described to be performed by AKT phosphorylation (Setoguchi and Kondo, 2004). Therefore, we searched for *Olig2* as a CK2 substrate. Comparative amino acids sequence analysis of mouse and human *Olig2* revealed that most conserved potential CK2 phosphorylation sites (S/T; E/D n-1, and/or E/D n+1, and/or E/D n+3; with any basic residues at positions n-1 and n+1) are observed within an N-terminal fragment encompassing M¹-Y¹⁷⁷ (Fig. 7). We fused mouse *Olig2* (1-177) fragment to GST, and determined *in vitro* CK2-dependent incorporation of [³²P] γ -ATP into purified fragment. We demonstrated that mouse *Olig2* (1-177) fragment is a CK2 substrate, but very importantly, the phosphorylation reaction is strictly dependent of the presence of the CK2 β regulatory subunit into the tetrameric ($\alpha^2\beta_2$) holoenzyme (Fig. 8A). Indeed, the CK2 α catalytic subunit alone was not able to phosphorylate this fragment. In agreement with previous experiments (Filhol *et al.*, 2004), a decrease potential in CK2 β -dependent phosphorylation specificity to *Olig2* (1-177) fragment was observed for the CK2 β ^{Pro 110 Asp} protein (Fig. 8B). To investigate CK2 β -dependent phosphorylation of mouse *Olig2* in a brain context, we analyzed after ion-exchange chromatography CK2 and *Olig2* phosphorylation activities in fractions obtained from E18.5 *CK2 β ^{wt}* and *CK2 β ^{2lox/2lox(+)}* mutant telencephalon extracts. In parallel, the presence of the AKT protein, CK2 α , and CK2 β subunits were searched in each fraction by Western blot analysis. As shown in Fig. 8C and from fractions obtained with *CK2 β ^{wt}* telencephalon extracts (left panel), CK2 α and CK2 β subunits followed the 0.25-0.3 M peak of the consensus CK2 activity as detected with the peptide RRREDEESDDEE (Songyang *et al.*, 1996). The pattern of *Olig2* phosphorylation paralleled exactly the chromatographic profile of CK2 activity. *Olig2* phosphorylation was abolished in the presence of 10 μ M of 4, 5, 6, 7-tetrabromobenzotriazole, a specific CK2 inhibitor (Sarno *et al.*, 20001; data not shown). In contrast, AKT profile peaked at 0.18M. When *CK2 β ^{2lox/2lox(+)}* mutant telencephalon extracts has been fractionated, the consensus CK2 activity peaked at 0.2M and CK2 α , but not CK2 β , followed this activity (Fig.8C, right panel). The *Olig2* phosphorylation activity detected in the 0.3M peak was related to remaining holoenzyme molecules derived from blood vessel cells present in dissected telencephalons, as CK2 β protein was detected in these fractions (see above). The consensus CK2 activities detected in peak fractions corresponding to wild type and mutant extracts were identical, in agreement with equal catalytic CK2 α subunit levels (Fig; 1D), whereas CK2 β -dependent *Olig2* activities revealed a ~ 40% decrease in the peak fraction derived from mutant extracts (data not shown). Altogether, these results point to CK2 tetrameric holoenzyme ($\alpha^2\beta_2$) as a major brain *Olig2* kinase.

We next mapped the epitopes of mouse *Olig2* (1-177) that are phosphorylated by the CK2 holoenzyme. Phosphoamino acid analysis revealed that phosphorylated residue(s) was (were) phosphoserine (data not shown). We generated GST-mouse *Olig2* deletion constructs (M¹-L⁷⁰, and M¹-Q¹⁰⁸) and demonstrated that efficient CK2 β -dependent incorporation of [³²P] γ -ATP into *Olig2* fragments (20 μ g) was performed when the construct encompassed the bHLH and the CREM1-dependent NES amino acids sequence (L¹⁰⁹-Y¹⁷⁷, Fig. 7 and Fig. 8D, left panel) whereas the only *Olig2* bHLH segment (L¹⁰⁹-Y¹⁷⁷, 2 μ g) was not phosphorylated by the CK2 $\alpha^2\beta_2$ holoenzyme (Fig. 8D, right panel). However, lower incorporation of [³²P] γ -ATP

(~30%) was still detected into Olig2 fragments M¹-L⁷⁰ and M¹-Q108. In several attempts and as previously described by Sun *et al.* (2003), we were unable to purified in large amounts the GST-fused L¹⁰⁹-Y¹⁷⁷ segment. This was essentially due to insolubility. Besides, we also demonstrated by GST pull-down assays using the Olig2 deletion constructs that the bHLH L¹⁰⁹-Y¹⁷⁷ segment was only responsible for the recruitment of the regulatory CK2 β subunit (Fig. 8E). This suggests that the interaction between Olig2 and CK2 β is specific. Pre incubation of the catalytic (α) and the regulatory (β) CK2 subunits that forms the tetrameric holoenzyme (CK2 $\alpha^2\beta_2$), did not prevent the L¹⁰⁹-Y¹⁷⁷ segment dependent-interaction with mouse Olig2 (data not shown). We confirmed this interaction by coimmunoprecipitation in transiently transfected COS7 cells (Fig. 8F). It should be noted that the CK2 α subunit was present in the immunoprecipitates in agreement with CK2 acting mainly as a tetrameric holoenzyme. Thus, we propose that the bHLH domain of Olig2 is sufficient to promote a physical interaction with CK2 via its regulatory CK2 β subunit. This CK2 β -dependent interaction could possibly triggers the CK2 β -dependent serine phosphorylation detected in the most N-terminal part of mouse Olig2. It is of relevance to note that Olig2 Akt-dependent phosphorylation occurs within this N-terminal segment (S³⁰, Setoguchi and Kondo, 2004).

Discussion

We have inactivated the *CK2 β* gene in the precursors of neurons and glia (NSCs) by the Cre-lox-mediated gene activation and show here *CK2 β* unexpected developmental neural functions (Fig. 9). The mutant mice develop forebrain abnormalities. The defects include reduced proliferation of multipotent NSCs at the dentate gyrus and at the VZ levels with minimal apoptosis, and absence of NG2⁺, PDGFR α ⁺ OPCs. *In vitro* experiments confirm defects in proliferation and oligodendroglial NSC potentials and further demonstrate that *CK2 β* is required for self renewal NSC capacity. Our previous studies unravelled an essential *CK2 β* function in ES cell viability (Buchou *et al.*, 2003). In contrast, as detected by *in vitro* frequency neurosphere assays, NSC survival potential is not affected by the deletion of the *CK2 β* gene. Finally, the majority of *CK2 β* functions, if not all, act *via* CK2 β -dependent regulation of catalytic CK2 activity. Therefore, conditional loss of *CK2 β* has differing consequences depending on the cell type or its state of differentiation.

CK2 β is necessary for NSC proliferation/self renewal potentials in the forebrain

This is the first demonstration of a function for CK2 β in maintaining mammalian cellular proliferation *in vivo*. Previous studies attributed proliferation function of CK2 β in cultured *Drosophila* S2 cells (Bettencourt-Dias *et al.*, 2004) and in human fibroblast (Pepperkok *et al.*, 1991; Lorenz *et al.*, 1993). A role of CK2 β in proliferation or survival of Kenyon cells during brain development of *Drosophila* has been also suggested (Jauch *et al.*, 2002). As detected by reduced Ki67⁺, BrdU⁺ and PH3⁺ mitotic cell numbers, absence of CK2 β signalling results in a reduction in dividing cells in embryonic germinal zones such as the dentate gyrus of the hippocampus and the VZ. Self renewing divisions of NSC that allow for the maintenance of a stem cell pool are critical for the formation of the CNS. Positive and negative factors, such as Wnt-1/ β -catenin pathway (McMahon and Bradley, 1990; Chenn and Walsh, 2002), Jagged1/Notch pathway (Nyfeler *et al.*, 2005; Hitoshi *et al.*, 2002), MELK (Nakano *et al.*, 2005), PTEN (Groszer *et al.*, 2001), p21 (Kippin *et al.*, 2005), or p53 (Meletis *et al.*, 2005) influence this process. Although there was no effect of CK2 β loss on the numbers of EGF and/or FGF2-dependent primary neurospheres derived during dissection of the telencephalon at E18.5, the proliferation rate of mutant NSCs in this *in vitro* assay was strongly reduced, suggesting a cell autonomous effect. Moreover, using self renewal assays as a reporter of NSC *in vitro*, we can show that CK2 β is necessary for the formation of secondary neurospheres. Thus, it appears that CK2 β loss affects the maintenance, but not the generation, of mammalian NSC. In line of this conclusion, analysis of the transcriptome of CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant E18.5 telencephalons in comparison to their wild type counterparts did not reveal differential expression of NCS markers such as Sox2, MELK, and Nestin (data not shown). The ES rescue experiments described in Fig. 8, suggest that the CK2 β proliferation effect is resumed *via* a positive modulation of CK2 phosphorylation activity. Importantly, CK2 is frequently activated in human cancer and in normal tissue with high mitotic index (reviewed in Olsten and Litchfield, 2004). However, strict CK2 β -dependent CK2 substrate(s) involved in tumorigenesis and/or increased proliferation has still to be discovered.

CK2 β and OPC development

The other main characteristic of self renewing NSCs present in neurosphere *in vitro* is multipotency. They form neurons, astroglia, and oligodendroglia. CK2 β -ablated neurospheres fail to produce O4⁺ pre oligodendrocytes, suggesting deficient oligodendrogenesis. Oligodendrocyte lineage progression is a multiple steps process (Cai *et al.*, 2005; Fig.9). *In vitro and in vivo* studies demonstrate that the deletion of the CK2 β gene in Nestin⁺ NSC blocks the generation of NG2⁺, PDGFR α ⁺ OPC (this manuscript). Progenitors and OPCs are dividing cells. The defect in the proliferation characteristic of mutant NSCs could account for the absence of OPCs. In fact, we favour intrinsic regulation properties of CK2 β in the transition step that triggers progenitors to generate OPCs. First, the presence of Olig2⁺, Sox10⁺, or NKx2.2⁺ progenitors suggest early commitment of CK2 β -deficient NSCs into the oligodendrocyte lineage. Moreover, the percentage of Sox10⁺ progenitors is identical in mutant neurosphere differentiation assays when compared to their wild type counterparts. Second, loss of function for Jagged1/Notch, MELK, PTEN, and p53 which affect NSC proliferation do not interfere with their differentiation potential including oligodendrogenesis (Nyfeler *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2005; Groszer *et al.*, 2006; Meletis *et al.*, 2005). Third, neurosphere frequency assays show that EGF-, FGF2-, and PDGF-AA-dependent signalling pathways are effective in mutant NSCs and can not account for a defect in the instruction of NSCs for oligodendroglial capacities (Chandran *et al.*, 2003; Gabay *et al.*, 2003; Chojnacki and Weiss, 2004; Sun *et al.*, 2005). In particular, PDGF-AA has been shown to regulate adult NCS neurogenic/oligodendroglial potentials (Jackson *et al.*, 2006). In contrast, our results show that CK2 β function modulates the NSC oligodendroglial/astroglial balance with any effect on neurogenesis (Fig. 3F). This also argues against the hypothesis that deficiency in PDGF-AA-dependent signals would be responsible for the lack of PDGFR α ⁺ OPC in CK2 β mutant neurosphere differentiation assays (Fig. 3E). Identical assumption has been made for the hedgehog signalling pathway. Indeed, hedgehog signalling induces early progenitors of the oligodendrocyte lineage (for reviews, see Richardson *et al.*, 2000; Spassky *et al.*, 2000). However, using *Smoothened*^{-/-} ES cells, Cai *et al.* (2005) recently provided genetic evidence that oligodendrogenesis can occur independently of hedgehog signalling, suggesting that a deficiency in this pathway can not explain totally the absence of OPC in CK2 β mutant telencephalons. Finally, in the forebrain oligodendrocyte are generated from multiple independent molecular, regional, and temporal origins. Any one of these populations take over when the others are destroyed (Kessaris *et al.*, 2006). Thus, elimination of forebrain OPC in CK2 β mutants should correspond to (a) molecular step(s) shared by the different progenitors and controlled by CK2 β .

Besides, ES experiments show that oligodendrogenesis is rescued when CK2 β proteins modulate positively CK2 phosphorylation activity. Therefore we searched for canonical determinants of oligodendrogenesis whose CK2 β -dependent CK2 phosphorylation would regulate their differentiation competences. Mash1 bHLH transcription factor specifies neurons and oligodendrocytes progenitors in embryonic and postnatal telencephalon (Parras *et al.*, 2004). It has been previously described that heterodimerization of Mash1 with the ubiquitously expressed bHLH E protein, E47, regulates CK2-mediated phosphorylation of Mash1 on Ser¹⁵² and consequently increases Mash1 protein stability (Viñals *et al.*, 2004). By using siRNA directed against CK2 β subunit, the authors demonstrate a reduction of hyperphosphorylate Mash1, suggesting that Mash1 is a CK2 β -dependent substrate. The decreases of Mash1 protein and Mash1 progenitors both *in vivo* and *in vitro* detected in

CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant E18.5 telencephalons confirm that CK2 modulate Mash1 protein stability. However, the neurogenic potential of CK2 β -ablated NCSs is not affected, and in *Mash1*^{-/-} mutant progenitor culture, specification of pre-oligodendrocytes is reduced by a 2-fold factor, but not absent (Parras *et al.*, 2004). The reduction of Mash1 progenitors could not account for the total defect in the generation of OPC detected in CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant E18.5 telencephalons and in neurosphere differentiation assays, and suggest *Mash1*-independent oligodendrogenesis.

We then focused on the bHLH transcription factor Olig2. During vertebrate embryogenesis, Olig2 is necessary for specification of oligodendrocytes (Lu *et al.*, 2002; Zhou and Anderson, 2002; Takebayashi *et al.*; 2002). A closely related homolog, Olig1, is co expressed with Olig2 in cells of the oligodendrocyte lineage. However, Olig1 function has been attributed not to develop the brain but to repair demyelinated lesions of the CNS. In all cells of the oligodendrocyte lineage and at all developmental stages, Olig2 is localized to the nucleus. In mature oligodendrocyte Olig1 is cytoplasmic, a localisation found in the *in vitro* neurosphere differentiation assay (Fig 4E, G), and transiently translocated to the nucleus during myelinisation process (Arnett *et al.*, 2004). Nuclear localization is important for transcription factor, and tight regulation of localization would interfere with their function. Whereas mechanism that control Olig1 sub cellular localization is not known, multiple regulations that dictate Olig2 localization and function has been published. First, ciliary neurotrophic factor-induced AKT-dependent phosphorylation of Olig2 on Ser³⁰ stimulates its export from the nucleus to the cytoplasm. Moreover, the translocation of Olig2 to the cytoplasm is essential for CNTF-induced astrocyte differentiation in mouse embryonic telencephalic neural progenitors (Setoguchi and Kondo, 2004). We noted that the AKT phosphorylation site (Ser 30) in human and mouse Olig2 is absent into human and mouse Olig1 amino acid sequences (Fig. 6). Thus, the N-terminal part of Olig2 designs a regulatory domain. Second, bone morphogenic protein 4, an inhibitor of oligodendroglial differentiation but an enhancer of astrocyte lineage commitment, changes the intracellular localization of Olig2 from a nuclear to a cytoplasmic localization in OPCs. This occurs predominantly through the induction of ID4 which by direct interaction sequesters Olig2 in the cytoplasm (Samanta and Kessler, 2004). ID4 is a helix-loop-helix transcription factor which does not contain the basic DNA binding domain adjacent to the helix-loop-helix dimerization domain and whose function lies in the timing of oligodendrocyte differentiation of OPCs (Kondo and Raff, 2000). Third, in the developing vertebrate spinal cord genetic interaction between the bHLH transcription factor *Scl* and Olig2 modulates the acquisition of the embryonic glial subtype (oligodendrocyte/astrocyte; Muroyama *et al.*; 2005). Fourth, inhibition of the repressor function of Olig2 favours astrocytogenesis during brain injuries (Buffo *et al.*, 2005). Finally, in *Olig2* or *Olig1/2* double knockout animals, more astrocytes are generated at the expense of oligodendrocytes (Lu *et al.*, 2002; Zhou and Anderson, 2002; Takebayashi *et al.*; 2002) and enforced expression of Olig2 in neural precursor cells obtained from E14.5 telencephalons inhibits cytokine-induced astrocyte differentiation (Fukuda *et al.*, 2004). Thus, loss and gain of function experiments propose that Olig2 function and/or localization determine the glial subtype. In parallel to the defect in the oligodendrocyte fate observed in mutant CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ *in vitro* neurosphere differentiation assays, we do reveal an increase in the percentage of GFAP⁺ astrocytes, suggesting a loss of Olig2 function that fits with the absence of NG2⁺ OPCs (Ligon *et al.*, 2006). The increase in astrogenesis is also consistent with a defect of *Mash1* function (Parras *et al.*, 2004). In mutant FCS neurosphere-derived differentiated cells, Olig2 is systematically found in the cytoplasm. Treatment with IGF1, an instructor of oligodendrogenesis for neural progenitor (Hsieh *et al.*, 2004), reverses Olig2

localization to the nucleus in CK2 β -depleted cultures. This nuclear localization in the mutant context induces a moderate, but detectable effect on the generation of OPCs, and is not effective for the O4⁺ preoligodendrocyte production. This suggests a lack of the total recovery of the Olig2 function. Therefore, in the CK2 β -deficient context, a strict correlation between nuclear localization of Olig2 and terminal oligodendrogenesis can not be ruled out. In mutant brain, a vast majority of nuclear Olig2⁺ cells is also observed. The discrepancy in subcellular localisation of Olig2 in pre progenitors detected between mutant neurosphere differentiation assays (cytoplasmic) and E18.5 telencephalons (nuclear) could result from the regulation by *in vitro* and *in vivo* environmental cues as previously described for CNTF (Setoguchi and Kondo, 2004) and observed for IGF1 (Fig. 4F). Alternatively, in mutant E18.5 telencephalons, CK2 β -dependent CK2 phosphorylated sites could be still effective since complete abolishment of the CK2 β protein occurs during late embryogenesis (Fig. 1D, E), whereas neurosphere differentiation analysis are shifted by 7 days. Hence, multiple inputs that involve bHLH, and phosphorylation codes modulate Olig2 function. We propose that CK2-dependent phosphorylation interferes with this combinatorial code for oligodendrocyte lineage progression. We demonstrates that Olig2 is a strict CK2 β -dependent CK2 substrate, probably by a CK2 β specific recruitment of Olig2 after direct interaction with the bHLH domain. A physical complex of Olig2 with the oligodendroglial cooperative homeodomain transcription factor Nkx2.2 has been already described to involve the Olig2 bHLH domain (Sun *et al.*, 2003). CK2-dependent phosphorylation occurs in an N-terminal regulatory domain of Olig2 shares by Akt (Setoguchi and Kondo, 2004). Interestingly, as observed for Ser³⁰ Akt-dependent phosphorylation site, putative Ser CK2 consensus sites are not conserved into Olig1 amino acid sequences (Fig. 6), suggesting that this N-terminal phosphorylated domain regulates specific Olig2 function(s). We also show that CK2 is a major Olig2 kinase in brain extracts. In addition, CK2 β ^{Pro 110 Asp} mutant protein that fails to rescue CK2 β functions in ES experiments is also deficient in effective phosphorylation of Olig2. More work is needed to design the exact CK2 phosphorylation site(s) and to evaluate consequences onto Olig2 function. However, these observations suggest CK2 has a determinant in the balance of the multiple inputs that trigger Olig2 functions. Alternatively, we can not exclude besides Mash1 and Olig2, others CK2 β -dependent CK2 substrates important for the oligodendroglial network that could act in synergy. These substrates need to be further determined.

CK2 β and neurogenesis

During development, neurogenesis occurs previously to the generation of oligodendrocytes, and in the spinal cord Olig2 is sequentially required for the motor neuron subtype and OPCs (Rowitch 2004). In embryonic telencephalic progenitors, specification of neuron subtypes and oligodendrocytes is also coupled and implicates both Olig2 and Mash1 (Yung *et al.*, 2002; Parras *et al.*, 2004). If the assumption for a defect into Olig2 and Mash1 functions in CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant brains is correct, it is therefore intriguing that *in vitro* and *in vivo* neurogenesis is not affected. First, the detection of β III-tubulin⁺ neurons in the neurosphere differentiation experiments discerns neurogenesis and cannot rule out a neuron subtype. In addition, CK2 β expression is detected until E16 and completely abolished at E18.5 during terminal embryogenesis. One can suggest that during this stage of development, when neurogenesis is completed, Olig2/Mash1⁺ progenitors are intrinsically competent to differentiate only into the oligodendroglial lineage and that the belated lack of CK2 β -

dependent CK2 phosphorylations interferes with the progression of progenitors to NG2⁺ OPCs. In line of this proposal we did detect Islet1⁺ motoneurons in the spinal cords of E18.5 mutant embryos, (data not shown) and E18.5 *in vitro* neurosphere differentiation studies recapitulate *in vivo* data.

Conclusion

Traditionally, CK2 has been regarded as a constitutively active ubiquitous Ser/Thr protein kinase in search of physiological function. We had previously shown that CK2 β plays a critical role in murine ES cell survival (Buchou *et al.*, 2003). In contrast, our conditional strategy demonstrates that CK2 β represents a central and non redundant signalling component in embryonic telencephalic neural stem cell oligodendroglial competence. As proposed for the *Drosophila* circadian mutant *Andante* (Akten *et al.*, 2003), we suggest CK2 β as a sensor of CK2 activity in mammalian differentiation mechanisms. Our animal model has been already successfully used to unravel a specific regulation of CK2 β in the modulation of acetylcholine receptor aggregation at the neuromuscular junction (Cheusova *et al.*, 2006). The versatility of CK2 suggests discoveries of relevant CK2 β physiological function(s) in diverse tissues. Conversely, CK2 upregulation is involved in tumour pathology, and its participation in cancers is believed to act through promotion of cell survival that protects the cell against stress (reviewed in Ahmed *et al.*, 2002). Herein, our results show that the regulatory subunit CK2 β interferes with the characteristics of neural stem cells. The deregulation in the homeostasis of brain stem cells contributes to malignant gliomas (reviewed in Kondo, 2006). Therefore, the search of new inhibitors that will affect the interaction between CK2 catalytic and regulatory subunits may lead to therapeutic agents targeting the Olig2⁺, NG2⁺ OPC lineage and might eradicate some malignant diffuse gliomas such as oligodendrogliomas or oligoastrocytomas.

Materials and methods

Mouse breeding

Mice were of a C57BL/6 background. Nestin-Cre transgenic mice kept as a heterozygous locus (Tronche *et al.*, 1999) were bred with $CK2\beta^{2lox/2lox}$ mice instead of $CK2\beta^{2lox/-}$. Double heterozygous mice (Nestin-Cre⁽⁺⁾, $CK2\beta^{wt/2lox}$) were bred back to $CK2\beta^{2lox/2lox}$ mice. This schedule avoids embryos with a heterozygous $CK2\beta^{2lox/-}$ background which has been shown to generate a gene dosage effect (Blond *et al.*, 2005). $CK2\beta$ mutant alleles, Southern blots and PCR analysis have been described previously (Buchou *et al.*, 2003).

Histological analysis, BrdU labelling, Ki67 labelling, mitotic activity, and TUNEL assay

E18.5 brains were fixed overnight by immersion in 4% paraformaldehyde at 4°C, embedded in paraffin, and cut into 5- μ m sections. Brain morphologies were analyzed after hematoxylin and eosin staining. In order to detect cells in the S, G2, and M phases, paraffin-embedded sections were incubated with a mouse monoclonal antibody anti-Ki67 1:100 (Dako). Bromodeoxyuridine (BrdU) labelling of cells, short pulse, from E18.5 telencephalon in the S phase of the cell cycle was performed according to the protocol described previously (Buchou *et al.*, 2003), and paraffin-embedded sections were incubated with a rat monoclonal antibody anti-BrdU 1:75 (ImmunologicalsDirect.com). To address changes in mitotic cell activity, we performed incubations with a rabbit antibody anti-phospho-histone H3 (ser10) 1:2000 (Upstate). For detection of apoptotic cells, nick end labelling of sections using the TdT-FragEL kit (Oncogene Research Products, Boston, MA) was performed according to the manufacturer's instructions.

Western blot analysis

Olfactory bulbs, cerebellum, and meningeal cells were removed from E18.5 dissected brains. Telencephalon protein extracts were obtained after homogenisation in TDNE buffer (25 mM Tris pH 8.5, 1 mM DTT, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA) and sonication. ES cells were lysed in TENT buffer (50 mM Tris pH7.5, 5 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100). All extraction procedures were done in the presence of protease inhibitors (25 μ g/ml leupeptin, 25 μ g/ml aprotinin and 1 mM AEBSF) and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma). Lysates were cleared by centrifugation. Equal amounts of protein (40 μ g) were analysed by 12% SDS-PAGE or with an 11% Tris/Tricine acrylamide gel and processed for Western blot analysis. Antibodies are rabbit anti-CK2 β (β c, 1/500) directed against the 12 carboxy-terminal human amino acid sequence (205-215), rabbit anti-CK2 α (1/1000) directed against a 27 human amino acids sequence (15-27), mouse anti-tubulin beta III isoform 1: 1000 (Chemicon), rabbit anti-PARP (1/1000, Cell Signaling), mouse anti-Mash1 (1/1000, BD Pharmingen), rabbit anti-phospho Akt (Ser473) and anti-Akt (1/1000, Cell Signaling), rabbit anti-Sox10 antibody (1/5000, a gift from Wegner M., University of Erlangen-Nurnberg, Germany), mouse anti-HA (clone 12CA5, 1/1000, Roche).

Neurosphere assay

Dissected E18.5 telencephalons were subjected to trypsin digestion for 15 min at 37°C. Tissue was mechanically dissociated into a single cell suspension, filtered through a 70 μ m cell strainer, and further treated with 10 μ g DNaseI (Roche) for 10 min at room temperature. Cells from individual embryos, 1.9 10^6 cells/10cm or 0.6 10^6 cells/6cm diameter uncoated plate, were cultured in bulk for neurosphere assay in serum-free medium 10 or 4 ml, respectively)

Running head: CK2 β and NSC capacities

with B27 complement (S-F, B27) containing 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF; PeproTech, Rocky Hill, NJ), and/or 10 ng/ml fibroblast growth factor-2 (FGF; gift from G. Bouche, Toulouse, France), or 100ng/ml Platelet-Derived Growth Factor-AA (PDGF-AA; AbCys, Paris, France). The number of primary spheres was counted after 4 days *in vitro* to evaluate the frequency of generated neurospheres. To assess for proliferation, primary spheres after 7 days, were treated during 20min at 37°C with a cell dissociation medium (Sigma) and mechanically individual dissociated cells were counted. These cells were also used to assess for self-renewal in a secondary neurosphere assay with 6 10^5 cells/10cm diameter uncoated plate. To determine multipotentiality, 4 day neurospheres were plated onto glass coverslips coated with 0.001% poly-L-lysine (Sigma) and shifted in S-F/B27 medium in the presence of 3.5% fetal bovine serum (FBS, Biowest; differentiating medium; Gritti *et al.*, 2002) or 500 ng/ml IGF-1 (recombinant mouse IGF-1, R&D systems; Hsieh *et al.*, 2004). 1 hr, 3 days, 5 days, or 11 days after plating differentiated cultures were fixed in 4% paraformaldehyde. Fixed cells were further processed for immunocytochemistry (see below).

Immunocytochemistry

E18.5 brains were fixed overnight by immersion in 4% paraformaldehyde at 4°C and were further incubated during 48 hr in PBS containing 30% sucrose at 4°C. 16- μ m cryosections were treated successively with blocking solution PBS/0.2% Triton X100/5% normal goat serum (NGS) for 20 min and with mouse IgG blocking reagent (Vector) for 1 hr. Fixed differentiated neurosphere cultures were incubated in blocking solution for 5 min. The following antibodies diluted in PBS/1% NGS were used to detect antigens: mouse anti-Nestin/rat-401 antibody (1/20, Hybridoma bank, University of Iowa), mouse anti-Mash1 antibody (1/300, BD Pharmingen), mouse anti- β III tubulin antibody (1/500; Babco), rat anti-GFAP antibody (1/500; USBiological), mouse anti-O4 antibody (1/10; a gift from Soula C., Université Paul Sabatier, Toulouse, France), rabbit anti-NG2 (1/100, Chemicon), rat anti-PDGF Receptor α chain (1/100, BD PharMingen), rabbit anti-Sox10 antibody (1/500, a gift from Wegner M., University of Erlangen-Nurnberg, Germany), mouse anti-Nkx2.2 antibody (1/10, Hybridoma Bank, University of Iowa, USA), rabbit anti-Olig2 antibody (1/2000, a gift from Chneiweiss H., Collège de France, Paris, France), rabbit anti-Olig1 antibody (1/5000, a gift from Rowitch D., Dana-Farber Institute, Boston, USA), rat anti-PECAM antibody (1/2, a gift from Vecchi A., Mario Negri Institute, Milan, Italy), followed by appropriate cyanin3-dye-conjugated, cyanin2-dye-conjugated (1/500, Jackson ImmunoResearch Laboratories) or Alexa488-dye-conjugated (1/500, Molecular Probe) secondary antibodies. Sections or cells were finally stained with Hoechst dye 33342 (2 μ g/ml) to visualize nuclei. The stained sections or cells were mounted in florescent mounting medium (Dako). The fluorescence image were acquired using a Zeiss fluorescent microscope (Axiovert 200M) or with a Leica (TCS SP2) confocal microscope, 16X and 40X objectives. Images were combined for figures using Adobe Photoshop 8.0.

CK2 activity and interaction tests

Crude E18.5 embryonic telencephalon extracts (adjusted to 5 mg/ml of protein concentration) were assayed for CK2 β -dependent CK2 kinase activity at 22°C for 10 min using 3 mM of the synthetic peptide RRREEETEEE (Homma *et al.*, 2002) and [32 P] γ -ATP. One unit of CK2 activity is defined as the amount of activity necessary to transfer 1 fmol of phosphate per minute into the synthetic peptide. Chromatographic fractions were assayed for 3 min with 150 μ M of the CK2 consensus synthetic peptide RRREDEESDDEE (Songyang *et al.* 1996). Isolated recombinant CK2 α and β subunits were expressed in Sf9 cells and/or bacteria,

Running head: CK2 β and NSC capacities

respectively, and purified to homogeneity (Filhol *et al.*, 1991). The PCR products corresponding to mouse Olig2 1-177, 1-108, and 1-70 coding region were amplified from the mOlig2 CMV2 template (Sun *et al.*, 2001) using the Expand High Fidelity PCR System (Roche) with the following oligonucleotide DNA primers: the 5' primer A 5'-TTGAATTCATATGGACTCGGACGCCAGCCT-3' and the 3' primers B 5'-AACTCGAGTCAGTAGATCTCGCTCACCAGTC-3', C 5'-AACTCGAGTCACTGCTGCA GCTCGGGCTCAG-3', D 5'-AACTCGAGTCACAGTTTGTCCCCGGGATGCG-3', respectively. The PCR products were subcloned into the pGEX4T2 vector (Amersham Biosciences). The PCR product corresponding to mouse Olig2 109-177 coding region was amplified using the 5' primer E 5'-TTGAATTCATATGCTGCGCCTGAAGATCAACAGCC GCGA-3' and the 3' primer B. Purified GST-mOlig2 (1-20 μ g) were incubated at 22°C for 0-30 minutes with 25 μ M [³²P] γ -ATP, and 12 mM MgCl₂ in the presence of 60-240 ng of CK2 α subunit with increasing amount of equivalent CK2 β subunit (0-230 ng) or with 5 μ l of chromatographic fractions.

Interaction assays were performed using pre bound GST- or GST-mOlig2 Glutathione Sepharose beads (Amersham Biosciences) equilibrated in PBS, 0.05% Tween 20, 1 mg/ml BSA and incubated in the presence of [³⁵S] methionine-labelled CK2 β (2.10⁵ cpm) at 22°C for 90 minutes. Phosphorylated proteins or bound CK2 subunits were analyzed by SDS electrophoresis and autoradiography.

For immunoprecipitations, transiently transfected COS7 cells were lysed in RIPA buffer in the presence of protease inhibitors (25 μ g/ml leupeptin, 25 μ g/ml aprotinin and 1 mM AEBSF), and for each extract, the expression level of protein was analyzed by Western blot. Five μ g of a monoclonal antibody against the Flag (Sigma) epitope was added and the reaction incubated under at 4°C for one hour. Next, 50 μ l of RIPA-equilibrated beads (eBioscience) was added and incubation was continued under constant rotation for one hour. After washing the beads four times with RIPA buffer, the precipitated proteins were analyzed by SDS electrophoresis and Western blot. For generation of HA-mOlig2 CMV2, a PCR product corresponding to mouse Olig2 1-176 coding region was amplified using the 5' primer 5'-TTGAATTCTGGGCCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGGACTCGG ACGCCAGCCT-3' and the 3' primer 5'-GAAGATCTCGCTCACCAGTCGCT-3' and subcloned into EcoRI/BglII sites of mOlig2 CMV2 (Sun *et al.*, 2001). Flag-chicken CK2 β PSG5 was generated after amplification of a PCR product using the 5' primer 5'-TTGGATCCGCCGCCACCATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGATGAGCAGCT CCGAGG-3' and the 3' primer 5'- GAAGATCTTCAGCGGATGGTCTTCACG-3'.

Retroviral infection and ES cell cultures

CK2 $\beta^{lox/-}$ ES cell line cultured in the presence of 10³ units/ml leukaemia inhibitory factor (LIF; Chemicon) and Cre-pMSCV-puro retroviral supernatant have been described previously (Buchou *et al.*, 2003). PCR products corresponding to HA-tagged wild type and mutant CK2 β coding regions were cloned into the retroviral vector pMSCV-neo (Clonetech). The following oligonucleotide DNA primers were synthesized: for the chicken HA-CK2 β^{wt} cDNA, the 5' primer 1 was 5'-CGGAATTCGCCGCCACCATGTATCCTTATGATGTTCTGATTATG CTATGAGCAGCTCCGAGGAGGTG-3', and the 3' primer 2 was 5'-GAAGATCTTCAG CGGATGGTCTTCACG-3'. For a $\Delta 2$ form of CK2 β (HA-CK2 $\beta^{\Delta 2}$ cDNA), deleted of the two last C-terminal amino acids (I²¹⁴, R²¹⁵) and found in tumor extracts (Filhol O., personal communication), the 3' primer 3 was 5'-AAGGATCCTCAGGTCTTCACGGG-3'. For a

Running head: CK2 β and NSC capacities

mutant in the β - β protein interface (Filhol *et al.*, 2004; HA-CK2 β ^{Pro 110 Asp} cDNA), mutagenesis was performed using the sens primer 5'-GATTTCTGGGTACTGCGACCGCGTCTACTGC-3' and the anti-sens primer 5'-GCAGTAGACGCGGTTCGCAGTACCCGAAATC-3'. Generation of the polyamine binding domain CK2 β ^{Glu 60,61,63 Ala} mutant was described previously by Leroy *et al.* (Leroy *et al.*, 1997). CK2 β retroviral supernatants were generated by transfection of BOSC23 cells (Pear *et al.*, 1993). Retroviral HA-tagged CK2 β -pMSCV-neo supernatants were first used to infect 2.5×10^4 /cm² CK2 β ^{2lox/-} ES cells. To avoid chimaeras colonies, one day after infection, ES cells were subjected to trypsin treatment and individual cells were plated. Neomycin selection (350 μ g/ml) was started 48 hr after infection and Neo^R clones were expanded and screened for expression of exogenous HA-tagged CK2 β proteins by Western blot analysis using mouse anti-HA antibody 1:1000 (clone 12CA5, 1/1000, Roche). Selected Neo^R clones were further infected with Cre-pMSCV-puro supernatant. One day after, individualized ES cells were plated and puromycin selection (1.5 μ g/ml) was started 48hr post infection for 6, 9 days. Individual clones were expanded and analyzed by PCR analysis and Southern blot for the absence of the CK2 β ^{2lox} allele, and by Western blot with the anti-CK2 β (β c) antibody for the absence of endogenous wild type CK2 β protein. Neo^R/Puro^R CK2 β ^{-/-} ES cells expressing only exogenous HA-CK2 β proteins were seeded in the absence of LIF (3×10^6 cells/10cm diameter uncoated plate/10 ml) for 8 days to form floating embryoid bodies (EBs). In order to stimulate neural differentiation, 5 μ M retinoic acid was added after the first 4 days and left for the last 4 days (Bibel *et al.*, 2004). EBs were further dissociated with trypsin and individual cells (3×10^6 cells/10cm diameter uncoated plate/10ml) were used in neurosphere assays.

Running head: CK2 β and NSC capacities

Acknowledgements

We thank B. Zalc for suggestions, D. Rowitch for providing Olig1 antibody and mouse Olig2 cDNA, M. Wegner for the gift of Sox10 antibody, H. Chneiweiss for the generous gift of Olig2 antibody, I. Marechal and S. Bama for their efficient help with mouse breeding.

The project was funded by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (to C.C.), the INSERM, and the CEA.

L. Z. was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer.

References

- Ahmed K, Gerber DA, Cochet C (2002) Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2 *TRENDS in cell Biol.* **12**:226-230
- Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N (2004) Radial glia serves as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* **41**:881-890
- Akten B, Jauch E, Genova GK, Kim EY, Edery I, Raabe T, Jackson FR (2003) A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nature neuroscience* **6**:251-257
- Arnett HA, Fancy SP, Alberta JA, Zhao C, Plant SR, Kaing S, Raine CS, Rowitch DH, Franklin RJ, Stiles CD (2004) bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS. *Science* **306**:2111-2115
- Bettencourt-Dias M, Giet R, Sinka R, Mazumdar A, Lock WG, Balloux F, Zafiropoulos PJ, Yamaguchi S, Winter S, Carthew RW, Cooper M, Jones D, Frenz L, Glover DM (2004) Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature* **432**:980-987
- Bibby AC, Litchfield DW (2005) The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2 β . *Int. J. Biol. Sci.* **1**:67-79
- Bibel M, Richter J, Schrenk K, Tucker KL, Staiger V, Korte M, Goetz M, Barde Y-A (2004) Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nature Neuroscience* **9**:1003-1009
- Bidwai AP, Reed JC, Glover CVC (1995) Cloning and disruption of *CKB1*, the gene encoding the 38-kDa β subunit of *Saccharomyces cerevisiae* Casein Kinase II (CKII). *J. Biol. Chem.* **270**:10395-10404
- Blond O, Jensen HH, Buchou T, Cochet C, Issinger OG, Boldyreff B (2005) Knocking out the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice: Gene dosage effects in ES cells and embryos. *Mol. Cell. Bioch.* **274**:31-37
- Buchou T, Vernet M, Blond O, Jensen HH, Pointu H, Olsen BB, Cochet C, Issinger OG, Boldyreff B (2003) Disruption of the regulatory β subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality *Mol. Cell. Biol.* **23**:908-915
- Buffo A, Vosko MR, Ertürk D, Hamann, GF, Jucker M, Rowitch D, Götz M (2005) Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: Implications for neuronal repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:18183-18188
- Cai J, Qi Y, Hu X, Tan M, Liu Z, Zhang J, Li Q, Sander M, Qiu M (2005) Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of *Nkx6* regulation and *Shh* signaling. *Neuron* **45**:41-53
- Chandran S, Kato H, Gerreli D, Compston A, Svendsen CN, Allen ND (2003) FGF-dependent generation of oligodendrocytes by a hedgehog-independent pathway. *Development* **130**: 6599-6609
- Chantalat L, Leroy D, Filhol O, Nueda M, Benitez M J, Chambaz EM, Cochet C, Dideberg O (1999) Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J.* **18**:2930-2940
- Chen M, Li D, Krebs EG, Cooper JA (1997) The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol. Cell. Biol.* **17**:1904-1912
- Chenn A, Walsh CA (2002) Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* **297**:365-369

- Cheusova T, Khan MA, Schubert SW, Gavin AC, Buchou T, Jacob G, Sticht H, Allende J, Boldyreff B, Brenner HR, Hashemolhosseini S (2006) Casein kinase 2-dependent serine phosphorylation of MuSK regulates acetylcholine receptor aggregation at the neuromuscular junction. *Genes & Dev.* **20**:1800-1816
- Chojnacki A, Weiss S (2004) Isolation of a novel platelet-derived growth factor-responsive precursor from the embryonic ventral forebrain. *J. of Neuroscience* **24**:10888-10899
- Filhol O, Cochet C, Wedegaertner P, Gill GN, Chambaz EM (1991) Coexpression of both alpha and beta subunits is required for assembly of regulated casein kinase II. *Biochemistry* **30**:11133-11140
- Filhol O, Nueda A, Martel V, Gerber-Scokaert D, Benitez MJ, Souchier c, Saoudi Y, Cochet C. (2003) Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits. *Mol. Cell. Biol.* **23**:975-987
- Filhol O, Benitez MJ, Cochet C (2004) A zinc ribbon motif is essential for the formation of functional tetrameric protein kinase CK2. in *Zinc Finger Proteins: From Atomic Contact to Cellular Function*, eds Iuchi S and Kuldell N, Landes Bioscience/Eurekah.com **chapter 18**:123-129
- Fogarty M, Richardson WD, Kessar N (2005) A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord. *Development* **132**:1951-1959
- Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**:325-330
- Fukuda S, Kondo T, Takebayashi H, Taga T (2004) Negative regulatory effect of an oligodendrocytic bHLH factor OLIG2 on the astrocytic differentiation pathway. *Cell Death Differ.* **11**:196-202
- Gabay L, Lowell S, Rubin LL, Anderson DJ (2003) Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro. *Neuron* **40**:485-499
- Glover CVC (1998) On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **59**:95-133
- Graus-Porta D, Blaess S, Senften M, Littlewood-Evans A, Damsky C, Huang Z, Orban P, Klein R, Schittny C, Muller U (2001) β 1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* **31**:367-379
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Garcia Verdugo JM, Herrera DG, Vescosi AL (2002) Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J. of Neuroscience* **22**:437-445
- Gratton MO, Torban E, Belanger Jasmin S, Theriault FM, German MS, Stifani S (2003) Hes6 promotes cortical neurogenesis and inhibits Hes1 transcription repression activity by multiple mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **23**:6922-6935
- Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, Kornblum HI, Liu X, Wu H (2001) Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* **294**:2186-2189
- Guerra B, Siemer S, Boldyreff B, Issinger OG (1999) Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2beta subunit fraction, devoid of the catalytic CK2alpha subunit, in mouse brain and testicles *FEBS Lett.* **462**:353-357
- Guerra B, Issinger OJ, Wang JY (2003) Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2 *Oncogene* **22**:4933-4942
- Hagemann C, Kalmes A, Wixler V, Schuster T, Rapp UR (1997) The regulatory subunit of protein kinase CK2 is a specific A-Raf activator. *FEBS Lett.* **403**:200-202

- Hall A, Giese NA, Richardson WD (1996) Spinal cord oligodendrocytes develop from ventrally derived progenitor cells that express PDGF alpha-receptors. *Development* **122**:4085-4094
- Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, Conlon RA, Mak TW, Bernstein A, van der Kooy D (2002) Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev.* **16**:846-858
- Homma MK, Li D, Krebs EG, Yuasa Y, Homma Y (2002) Association and regulation of casein kinase 2 activity by adenomatous polyposis coli protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:5959-5964
- Hsieh J, Aimone JB, Kaspar BK, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH (2004) IGF-1 instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes *J. Cell Biol.* **164**:111-122
- Jackson EL, Garcia-Verdugo JM, Gil-Perotin S, Roy M, Quinones-Hinojosa A, Vandenberg S, Alvarez-Buylla A (2006) PDGFR α -positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* **51**:187-199
- Jauch E, Melzig J, Brkulj M, Raabe T (2002) *In vivo* functional analysis of *Drosophila* protein casein kinase 2 (CK2) β -subunit. *Gene* **298**:29-39
- Kessarlis N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience* **9**:173-179
- Kippin TE, Martens DJ, van der Kooy D (2005) p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev.* **19**:756-767
- Kondo T, Raff M (2000) The id4 HLH protein and the timing of oligodendrocyte differentiation. *EMBO J.* **19**:1998-2007
- Leroy D, Heriche JK, Filhol O, Chambaz EM, Cochet C (1997) Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme. A proposed role for the kinase stimulation. *J. Biol. Chem.* **272**:20820-20827
- Ligon K, Kesari S, Kitada M, Sun T, Arnett HA, Alberta JA, Anderson DJ, Stiles CD, Rowitch DH (2006) Development of NG2 neural progenitor cells requires *Olig* gene function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:7853-7858
- Lin J-M, Kilman VL, Keegan K, Paddock B, Emery-Ly M, Rosbash M, Allada R (2002) A role for casein kinase 2 α in the *Drosophila* circadian clock. *Nature* **420**:816-820
- Lorenz P, Pepperkok R, Ansorge W, Pyerin W (1993) Cell biological studies with monoclonal and polyclonal antibodies against human casein kinase II subunit beta demonstrate participation of the kinase in mitogenic signaling. *J. Biol. Chem.* **268**:2733-2739
- Lu M, Grove EA, Miller RJ (2002) Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7090-7095
- Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD, Rowitch DH (2002) Common developmental requirement for *Olig* function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* **109**:75-8
- Luscher B, Litchfield DW (1994) Biosynthesis of casein kinase II in lymphoid cell lines. *Eur. J. Biochem.* **220**: 521-526

Running head: CK2 β and NSC capacities

- McMahon AP, Bradley A (1990) The Wnt-1 proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* **62**:1073-1085
- Meggio F, Boldyreff B, Marin O, Marchiori F, Perich JW, Issinger OG, Pinna LA (1992) The effect of polylysine on casein kinase 2 activity is influenced by both the structure of the protein/peptide substrates and the subunit composition of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **205**:939-945
- Meletis K, Wirta V, Hede S-M, Nistér M, Lundeberg J, Frisé J (2005) p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development* **133**:363-369
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:17528-17532
- Muroyama Y, Fujiwara Y, Orkin SH, Rowitch DH (2005) Specification of astrocytes by bHLH protein SLC in a restricted region of the neural tube. *Nature* **438**:360-363
- Nakamura Y, Sakakibara S-I, Miyata T, Ogawa M, Shimazaki T, Weiss S, Kageyama R, Okano H (2000) The bHLH gene *Hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J. of Neuroscience* **20**:283-293
- Nakano I, Paucar AA, Bajpai R, Dougherty JD, Zewail A, Kelly TK, Kim KJ, Ou J, Groszer M, Imura T, Freije WA, Nelson SF, Sofroniew, MV, Wu H, Liu X, Terskikh AV, Geschwind DH, Kornblum HI (2005) Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) regulates multipotent neural progenitor proliferation. *J. Cell Biol.* **170**:413-427
- Niefind K, Guerra B, Ermakowa I, Issinger O G (2001) Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.* **20**:5320-5331
- Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB (1996) Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *J. Neurosci. Res.* **43**:299-314
- Nyfeler Y, Kirch RD, Mantei N, Leone DP, Radtke F, Suter U, Taylor V (2005) Jagged1 signals in the postnatal subventricular zone are required for neural stem cell self-renewal. *The EMBO J.* **24**:3504-3515
- Olsten MEK, Litchfield DW (2004) Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2. *Biochem. Cell Biol.* **82**:681-693
- Parras CM, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, Johnson JE, Nakafuku M, Vescovi A, Guillemot F (2004) *Mash1* specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J.* **23**:4495-505
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. (1993) Production of helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:8392-8396
- Pepperkok R, Lorenz P, Jakobi R, Ansorge W, Pyerin W (1991) Cell growth stimulation by EGF: inhibition through antisense-oligodeoxynucleotides demonstrates important role of casein kinase II. *Exp. Cell. Res.* **197**:245-253
- Pinna LA (2002) Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J. Cell Sci.* **115**:3873-3878
- Reed JC, Bidwai AP, Glover CVC (1995) Cloning and disruption of *CKB2*, the gene encoding the 32-kDa β' subunit of *Saccharomyces cerevisiae* Casein Kinase II. *J. Biol. Chem.* **269**:18192-18200
- Richardson WD, Smith HK, Sun T, Pringle NP, Hall A, Woodruff R (2000) Oligodendrocyte lineage and the motor neuron connection. *Glia* **29**:136-142
- Richardson WD, Kessar N, Pringle N (2006) Oligodendrocyte wars. *Nature Reviews Neuroscience* **7**:11-18

- Roussou I, Draetta G (1994) The *Schizosaccharomyces pombe* casein kinase II α and β subunits: evolutionary conservation and positive role of the β subunit. *Mol. Cell. Biol.* **14**:576-586
- Rowitch DH (2004) Gial specification in the vertebrate neural tube. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**:409-419
- Samanta J, Kessler JA (2004) Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation. *Development* **131**:4131-4142
- Sarno S, Reddy H, Meggio F, Ruzzene M, Davies SP, Donella-Deana A, Shugar D, Pinna LA (2001) Selectivity of 4, 5, 6, 7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Letters* **496**:44-48
- Setoguchi T, Kondo T (2004) Nuclear export of Olig2 in neural stem cells is essential for ciliary neurotrophic factor-induced astrocyte differentiation. *J. Cell Biol.* **166**:963-968
- Sonyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai LH, Filhol O, Cochet C, Brickey DA, Soderling TR, Bartleson C, Graves DJ, DeMaggio AJ, Hoekstra MF, Blenis J, Hunter T, Cantley LC (1996) A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: Primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmoduline-dependent kinase II, CDK5, and ERK1. *Mol. Cell. Biol.* **16**:6486-6493
- Spassky N, Olivier C, Perez-Villegas E, Gouget-Zalc C, Martinez S, Thomas J, Zalc B (2000) Single or multiple oligodendrocyte lineages: a controversy. *Glia* **29**:143-148
- Spassky N, Heydon K, Mangatal A, Jankovski A, Olivier C, Queraud-Lesaux F, Goujet-Zalc C, Thomas JL, Zalc B (2001) Sonic hedgehog-dependent emergence of oligodendrocytes in the telencephalon: evidence for a source of oligodendrocytes in the olfactory bulb that is independent of PDFGR α signaling. *Development* **128**:4993-5004
- Stolt CC, Rehberg S, Ader M, Lommes P, Riethmacher D, Schachner M, Bartsch U, Wegner M (2002) Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev.* **16**:165-170
- Sun T, Echelard Y, Lu R, Yuk D-I, Kaing S, Stiles CD, Rowitch DH (2001) Olig bHLH proteins interact with homeodomain proteins to regulate cell fate acquisition in progenitors of the ventral neural tube. *Current Biology* **11**:1413-1420
- Sun T, Dong H, Wu L, Kane M, Rowitch DH, Stiles CD (2003) Cross-repressive interaction of the Olig2 and Nkx2.2 transcription factors in developing neural tube associated with formation of a specific physical complex. *The J. of Neuroscience* **23**:9547-9556
- Sun Y, Goderie SK, Temple S (2005) Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells. *Neuron* **45**:873-886
- Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, Chisika O, Ikenaka K, Nabeshima Y (2002) The basic helix-loop-helix factor Olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Current Biology* **12**:1157-1163
- Toczyski DP, Galgoczy DJ, Hartwell LH (1997) CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* **90**:1097-1106
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nature genetics* **23**:99-103
- Tropepe V, Sibilina M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D (1999) Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Developmental Biology* **208**:166-188
- Vallstedt A, Klos JM, Ericson J (2005) Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron* **45**:55-67

Running head: CK2 β and NSC capacities

- Viñals F, Reiriz J, Ambrosio S, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F (2004) BMP-2 decreases Mash1 stability by increasing Id1 expression. *EMBO J.* **23**:3527-3537
- Wegner M, Stolt CC (2005) From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *TRENDS in Neurosciences* **28**:583-588
- Xin M, Yue T, Ma Z, Wu FF, Gow A, Lu QR (2005) Myelination and axonal recognition by oligodendrocytes in brain are uncoupled in *olig1*-null mice. *J. of Neuroscience* **25**:1354-1365
- Xu X, Toselli PA, Russell LD, Seldin DC (1999) Globozoospermia in mice lacking the casein kinase α' catalytic subunit. *Nature* **23**:118-121
- Yung SY, Gokhan S, Jurcsak J, Molero AE, Abrajano JJ, Mehler MF (2002) Differential modulation of BMP signalling promotes the elaboration of cerebral cortical GABAergic neurons or oligodendrocytes from a common sonic hedgehog-responsive ventral forebrain species. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:16273-16278
- Zeng H, Qian Z, Myers MP, Rosbash M. (1996) A light-entrainment mechanism for the *Drosophila* circadian clock. *Nature* **380**:129-135
- Zhou Q, Choi G, Anderson DJ (2001) The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron* **31**:791-807
- Zhou Q and Anderson DJ (2002) The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* **109**:61-73

Legend Figures

Figure1. E18.5 embryos that lack CK2 β in the nervous system show defects in the forebrain.

(A) Live-born mice, P0 pups and E18.5 embryos were genotyped by tail DNA PCR. (B) Representative coronal paraffin-embedded sections through the E18.5 forebrains were analyzed by hematoxylin and eosin staining. Gross morphology appeared similar between wild type (CK2 β +) and mutant (CK2 β -) forebrains in the neocortex (c). By contrast, the developing hippocampal (h) dentate gyrus (asterisk) was distinct in the wild types but almost undetectable in the mutants. Note that neuronal cell bodies in CA fields were loosely associated with each other (arrowheads). Loss of CK2 β in the central nervous system led to enlargement of lateral ventricles (lv). At the level of corpus callosum (cc), linear arrays of cells (arrows), were absent in the mutants. Scale bars =100 μ m. (C) Strategy to detect Cre-dependent recombination into the brain. Genotyping was performed by PCR analysis (left) with tail DNA using primers 3 and 4 to detect the CK2 β ^{wt} and CK2 β ^{2lox} alleles, and Cre forward and Cre reverse primers to detect the Cre cDNA (Buchou *et al.*, 2003). For Southern blot hybridization (right), genomic telencephalon DNA was digested with XhoI and hybridized with the internal probe (Buchou *et al.*, 2003). The concomitant presence of the CK2 β allele with the absence of the CK2 β ^{2lox} allele were detected in CK2 β ^{2lox/2lox(+)} E18.5 embryos. The genotypes are indicated above. (D, E) Western blot analysis of CK2 α and CK2 β with telencephalon extracts from E18.5 and E16 embryos, respectively. CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant extracts (asterisk) were mentioned above the lanes. To ensure equal amount of loading and to appreciate the level of neurogenesis into embryonic telencephalons, a neuron specific class III β -tubulin antibody was used. (F) The CK2 β -dependent CK2 activity in mutant (CK2b-) and wild-type (CK2b+) E18.5 telencephalon extracts was determined using the synthetic peptide RRREEETEEE. Kinase activities are shown as the mean \pm s.d. of quadruplicates from three independent extracts, $P < 0.001$ by Student's *t* test.

Figure2. CK2 β loss compromises proliferation in the E18.5 forebrain and in neural stem cells *in vitro*

(A) At E18.5, CK2 β mutant embryos (CK2 β -) have an absence in Ki67-positive dividing hippocampal dentate gyrus progenitor cells (asterisk), a reduction in BrdU-positive S-phase cells (outlined with a dotted line), and almost an absence of PH3-positive mitotic cells in the ventricular zone (VZ) compared to wild-type littermates (CK2 β +). TUNEL assays show minimal apoptosis in mutant embryos. Scale bars =100 μ m. (B) Quantification revealed a highly significant (Student's *t* test $P < 0.001$), ~60% reduction in BrdU-positive S-phase cells in the VZ of mutants (CK2b-, n=3, and 3 non-consecutive sections) compared to wild-type littermates (CK2b+, n=3, and 3 non-consecutive sections). (C) Western blot analysis of poly (ADP-ribose) polymerase, PARP, with telencephalon extracts from E18.5 embryos. CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant extracts (asterisk) were mentioned above the lanes. Lane 4 represents the staurosporine-treated (1 μ M, 3 hrs) NIH 3T3 positive control extract. Cleaved PARP (arrow) serves as a marker of cells undergoing apoptosis. (D) E18.5 CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant telencephalon cells (CK2 β -) generate neurospheres after 4 days in culture (N1:day4). When compared with wild-type (CK2 β +), the mutant neurospheres become smaller after 7 days in culture (N1:day7) and are not capable of forming new neurospheres after dissociation (N2:day7), demonstrating a defect in proliferation and self-renewal capacities. Scale bar

=100 μ m. (E) Identical frequency capacity for E18.5 telencephalic mutant and wild-type cells to generate neurosphere in the presence of 10 ng/ml of each FGF2 and EGF after 4 days in culture (N1:day4). Percentage represents the number of generated neurospheres/the number of seeded E18.5 telencephalic cells in the dish x 100. (F) Quantification revealed a highly significant (Student's *t* test $P < 0.001$), approximately 95% reduction in cell number in mutant neurospheres (CK2b-, n=3 E18.5 telencephalons) compared to wild-type littermates (CK2b+, n=3 E18.5 telencephalons). All bars in graphs B, E, and F indicate mean \pm s.d.

Figure3. CK2 β gene is required for OPC development in neurosphere differentiation assays

(A) Immunostaining showing expression of the neural progenitor marker, nestin, in CK2 β -deficient neurospheres (a). Mash1 immunostaining in neural progenitors present in neurosphere cultures (b), and in rostral E18.5 telencephalon cryosections (c). (B) Quantification of Mash1⁺ cells showed a significant reduction (Student's *t* test $P < 0.05$) in the number of immature progenitors expressing this transcription factor and present in CK2 β -ablated neurospheres (CK2b-) compared to wild-type controls (CK2b+). (C) Western blot analysis of E18.5 telencephalon extracts for Mash1 levels. CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant extracts (asterisk) were mentioned above the lanes. (D) CK2 β -deficient neural progenitors retain the ability to form GFAP⁺ astrocytes and Tuj1⁺ neurons, but fail to generate O4⁺ pre oligodendrocytes in neurosphere differentiation assays. (E) CK2 β loss alters also the generation of NG2⁺ and PDGFR α ⁺ OPCs. (F) Quantification of cells immunostained for lineage-specific markers showed in parallel to a complete absence of O4⁺ pre oligodendrocytes a highly significant increase (Student's *t* test $P < 0.001$) in the percentage of GFAP⁺ astrocyte detected in CK2 β -ablated neurosphere differentiation cultures (CK2b-, n=12 E18.5 mutant telencephalon-derived neurosphere differentiation cultures) compared to wild-type controls (CK2b+, n=26 E18.5 wild-type telencephalon-derived neurosphere differentiation cultures). In these experiments, the percentage of Tuj1⁺ neurons did not differ between wild-type and mutant cultures. Total cell number was evaluated using Hoechst-stained nuclei. Bars indicate mean \pm s.d. Scale bars in A, D, E =100 μ m.

Figure4. Detection and localisation of oligodendroglial committed progenitor markers in CK2 β -depleted neurosphere differentiation assays

Expression of oligodendroglial committed progenitor markers, Sox10 (A) and Nkx2.2 (B), in CK2 β -deficient neurospheres. (C) Absence of nuclear Olig2⁺ cells in CK2 β -deficient neurospheres, and coimmunostaining with antibodies against the astroglia marker GFAP showing that nuclear Olig2⁺ cells were exclusively GFAP⁻. (D) Western blot analysis of E18.5 telencephalon extracts for Akt and phospho-activated Akt levels. CK2 β ^{2lox/2lox(+)} mutant extracts (asterisk) were mentioned above the lanes. (E) Confocal analysis was used to reveal cytoplasmic Olig1 expression in O4⁺ pre oligodendrocytes generated from wild-type differentiation neurosphere cultures and in astrocyte-like cells derived from parallel mutant cultures. (F) IGF1-treatment of mutant neurosphere restores the presence of nuclear Olig2⁺ cells in differentiation cultures, but was not sufficient to generate pre oligodendrocytes, as detected by confocal analysis after coimmunostaining with antibodies against the O4 marker. (G) In contrast, IGF1-treatment did not interfere with the cytoplasmic localization of Olig1 in O4⁺ pre oligodendrocytes generated from wild-type neurospheres. (H) A few NG2⁺ OPCs are

detected in IGF1-treated mutant neurospheres. Scale bars in A, B, C, H =100 μ m and in E, F, G =20 μ m.

Figure5. CK2 β gene is required for NG2 OPC development in the telencephalon.

(A) IHC for NG2 (green) in coronal E18.5 wild-type telencephalon cryoprotected sections demonstrates the normal appearance of multiprocessed NG2⁺ parenchymal OPCs at the lateral ventricle level (arrows) and their absence in CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ mutant mice. The pattern of NG2 staining in vessel pericytes parallels PECAM/CD31 labelling (red) in endothelial cells and is unaffected. (B) Expression of Olig2 was analyzed by IHC on cryoprotected sections of E18.5 telencephalon of wild-type (CK2 β ⁺) and mutant (CK2 β ⁻) embryos. Note decrease parenchymal Olig2⁺ OPCs in favour of increase Olig2⁺ progenitors in the VZ in the mutant sections (areas indicated by arrowheads). (C) Olig2 is nuclear in wild-type and occasionally cytoplasmic in mutant sections. (D) IHC for the oligodendroglial committed progenitor marker, Sox10 shows their presence in coronal CK2 β -deficient telencephalon cryoprotected sections (upper panel). Western blot analysis (lower panel) of E18.5 telencephalon extracts for Sox10 levels reveals identical Sox10 expression in wild-type and mutant extracts (asterisk). Scale bars in A, B, D =100 μ m and in C =10 μ m.

Figure6. CK2 β function is necessary and sufficient for oligodendroglial differentiation

(A) Restoration of ES cell viability (Buchou *et al.*, 2003) after puro^R/Cre retroviral infection of CK2 β^{2lox} ES cells upon exogenous expression of neo^R/HA-tagged CK2 β^{wt} . CK2 $\beta^{wt/2lox}$ ES cells were infected in parallel and served as a positive control. (B) Western blot analysis with anti-CK2 β (left panel) and anti-HA (right panel) antibodies of CK2 β^{2lox} (slot 1), CK2 β^{2lox} + HA-tagged CK2 β^{wt} expression (slot2), and CK2 β^{-} nullizygous ES cells rescued by exogenous HA-tagged CK2 β^{wt} expression (slot3). Note the complete absence of the endogenous CK2 β protein in slot3. (C) Concomitant with ES cell viability rescue, O4⁺ pre oligodendrocytes were identified in nullizygous CK2 β^{-} + HA-tagged CK2 β ES-derived neurosphere differentiation assays. Scale bar =100 μ m. (D) Relative frequency potential to generate embryoid bodies (EBs) with retinoic acid in the absence of LIF of nullizygous CK2 β^{-} ES cells viability-rescued by exogenous expression of CK2 β^{wt} or mutant proteins. (E) Relative cell numbers measured after trypsin dissociation of EBs. (F) Relative frequency capacity to generate neurospheres in the presence of FGF2+EGF of EB-dissociated cells. (G) Relative cell numbers measured after trypsin dissociation of neurospheres. (D-G) Quantification data were obtained from independent *in vitro* differentiation experiments (n=7) and evaluated in comparison to nullizygous CK2 β^{-} ES cells viability-rescued by exogenous expression of CK2 β^{wt} which were referred as 100% in each independent experiment. (**, Student's *t* test $P<0.001$).

Figure7. Amino acids alignment of Olig2 and Olig1 from mouse and human.

Areas in bold characters represent bHLH domains and Nuclear Export Signal amino acid sequences are in italic. Putative CK2 phosphorylation sites are underlined and the Akt-phosphorylated serine residues 30 are boxed.

Figure8. CK2 β positively modulates CK2-dependent phosphorylation of mouse Olig2 *in vitro*.

(A) Autoradiography of the purified recombinant mouse Olig2 1-177 fragment (5 μ g) after *in vitro* phosphorylation by either the CK2 α catalytic subunit alone (60ng) or in combination with increased amounts of the regulatory subunit CK2 β (0-120ng) that forms increased amounts of the holoenzyme ($\alpha^2\beta_2$). Note that CK2 β , an auto substrate of catalytic α subunit, competed in the reaction for the CK2 phosphorylation of mouse Olig2 when present in excess. Loading controls has been checked after coomassie staining of the gel (*). (B) Autoradiography of the purified recombinant mouse Olig2 1-177 fragment (1 μ g) after *in vitro* phosphorylation by either the CK2 α catalytic subunit alone (240ng) or in combination with increased amounts of the wild type or mutant Pro 110 Asp regulatory subunit CK2 β fused to MBP (0-345ng). Loading controls has been checked after coomassie staining of the gel (*). The panels represent relative quantification of the 32 P radioactivity incorporated into Olig2 1-177 fragment or MBP-CK2 β proteins after autophosphorylation. (\blacktriangle) MBP-CK2 β^{wt} , (\blacksquare) MBP-CK2 $\beta^{\text{Pro 110 Asp}}$. (C) DEAE-Sephacel chromatography of wild type (CK2 β +) and mutant (CK2 β -) crude E18.5 telencephalon protein extracts (3 mg). One ml fractions were collected. 5 μ l portions of each fractions were analyzed for consensus relative CK2 activity with the RRREDEESDDEE synthetic peptide (dark profiles) and for relative CK2 β -dependent mouse Olig2 CK2 activity (grey profiles). Peaks of CK2 activity profiles were arbitrary referred as 100%. In parallel, portions (80 μ l) of each fractions were immunoblotted to detect the presence of CK2 α , CK2 β , and Akt proteins (lower panels), with the exception of the analysis of the CK2 β protein in fractions derived from mutant extracts in which portions (800 μ l) were TCA-precipitated to allow detection. (D) Left panel-Autoradiography of purified mouse Olig2 deletion segments (20 μ g) after *in vitro* phosphorylation by the CK2 holoenzyme (240ng CK2 α + 690ng MBP-CK2 β , equivalent to a 1/2 ratio). MBP-CK2 β fusion protein was used instead of CK2 β since its electrophoretic mobility did not interfere with recombinant segments. Right panel-Autoradiography of the purified mouse Olig2 bHLH segment (109-177, 2 μ g). Note increased autophosphorylation of MBP-CK2 β in Olig2 bHLH (109-177) segment experiment due to a lack in substrate competition in the reaction. Loading controls has been checked after coomassie staining of the gel (*). (E) Recombinant GST fusion proteins containing different Olig2 epitopes were incubated with [35 S] methionine-labelled CK2 β . The ability of the GST fusion proteins to pull down the CK2 β subunit was detected by autoradiography after electrophoresis. At the *left*, one-tenth of the input is shown. Loading controls has been checked after coomassie staining of the gel (*). (F) Interaction between CK2 β and Olig2 was investigated by binding studies in extracts from transiently transfected COS7 cells. Western blots are shown for coimmunoprecipitation of (left panel) Olig2, and concomitantly of (right panel) CK2 α by CK2 β .

Figure9. Proposal of CK2 β functions along the lineage progression from ES cells towards oligodendrogenesis

1) ES cell viability. 2) NSC proliferation and self-renewal potentials. 3) Generation of OPCs.

Fig. 1

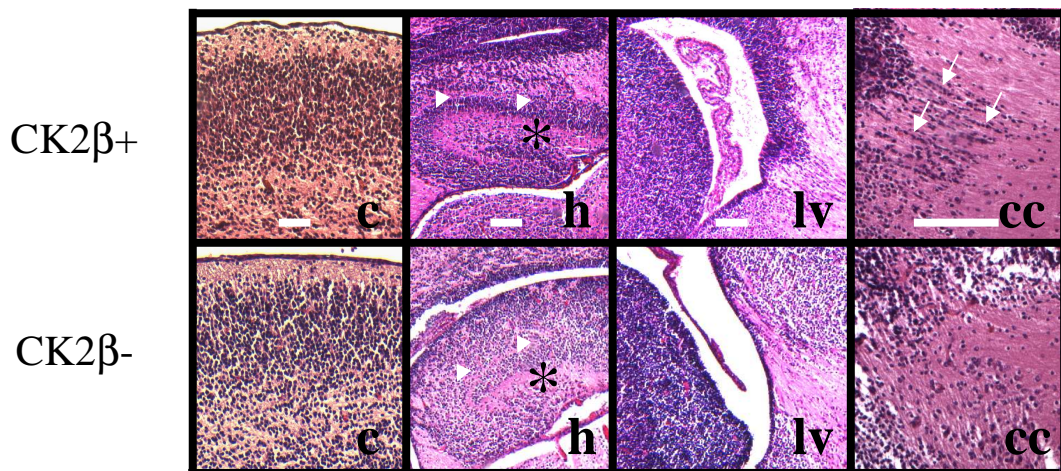
A

Genotypes of live-born mice and embryos from Nestin-Cre (+), CK2 $\beta^{wt/2lox}$
X
CK2 $\beta^{2lox/2lox}$ crossings

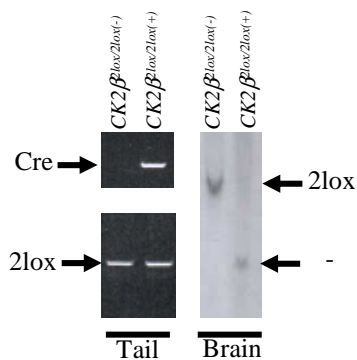
	No. Of offspring or embryo with genotype:			
	CK2 $\beta^{wt/2lox(-)}$	CK2 $\beta^{2lox/2lox(-)}$	CK2 $\beta^{wt/2lox(+)}$	CK2 $\beta^{2lox/2lox*}$
Live-born mice	22	18	15	0*
P0	3	5	4	5*
E18.5	78	78	81	82*

*: CK2 $\beta^{2lox/2lox(+)}$ offsprings or embryos are referred as mutants

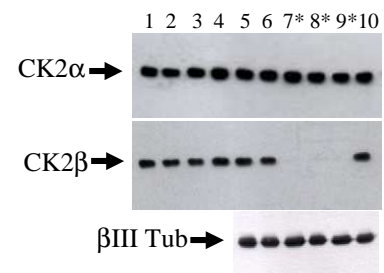
B



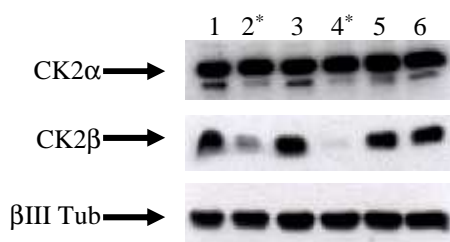
C



D



E



F

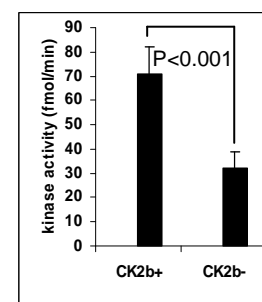
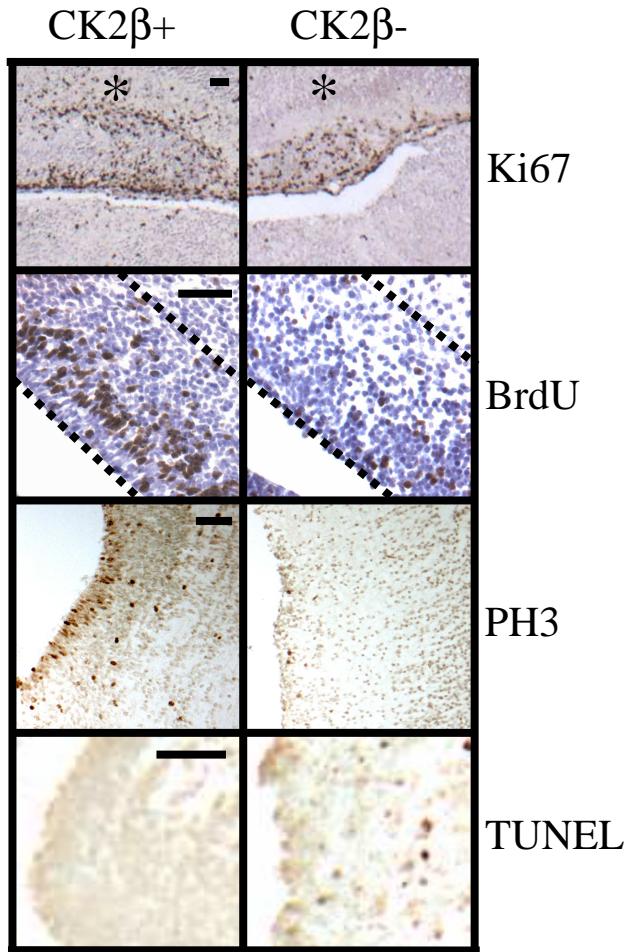
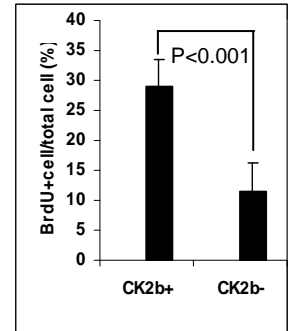


Fig. 2

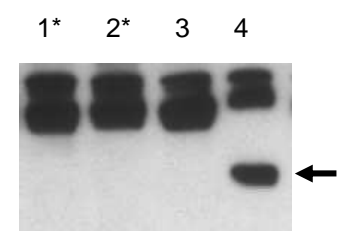
A



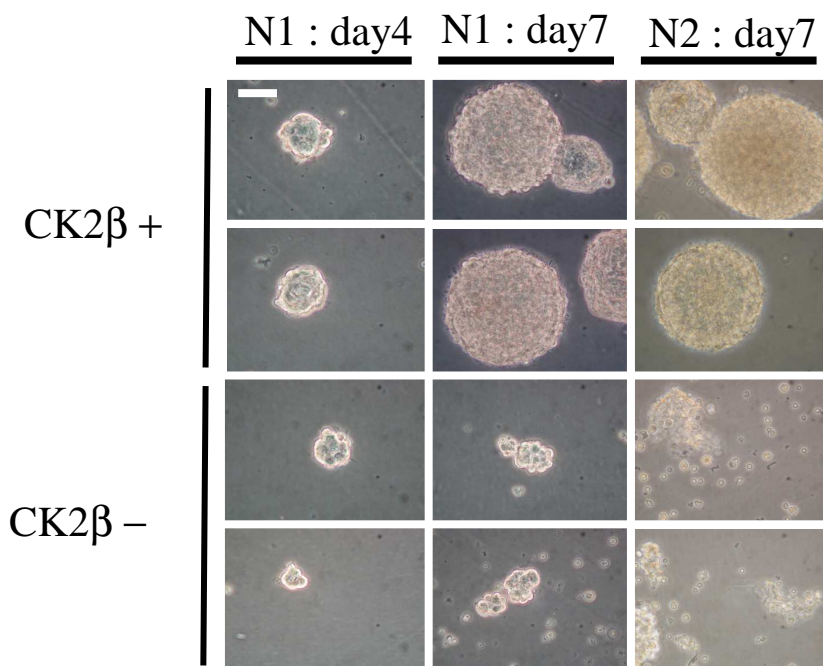
B



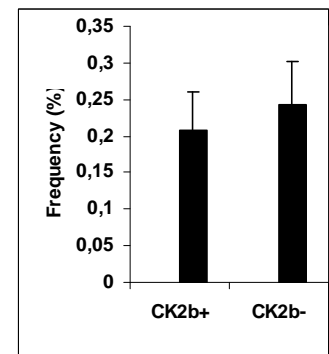
C



D



E



F

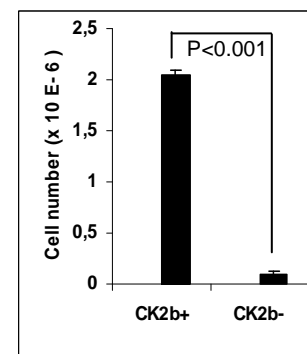


Fig. 3

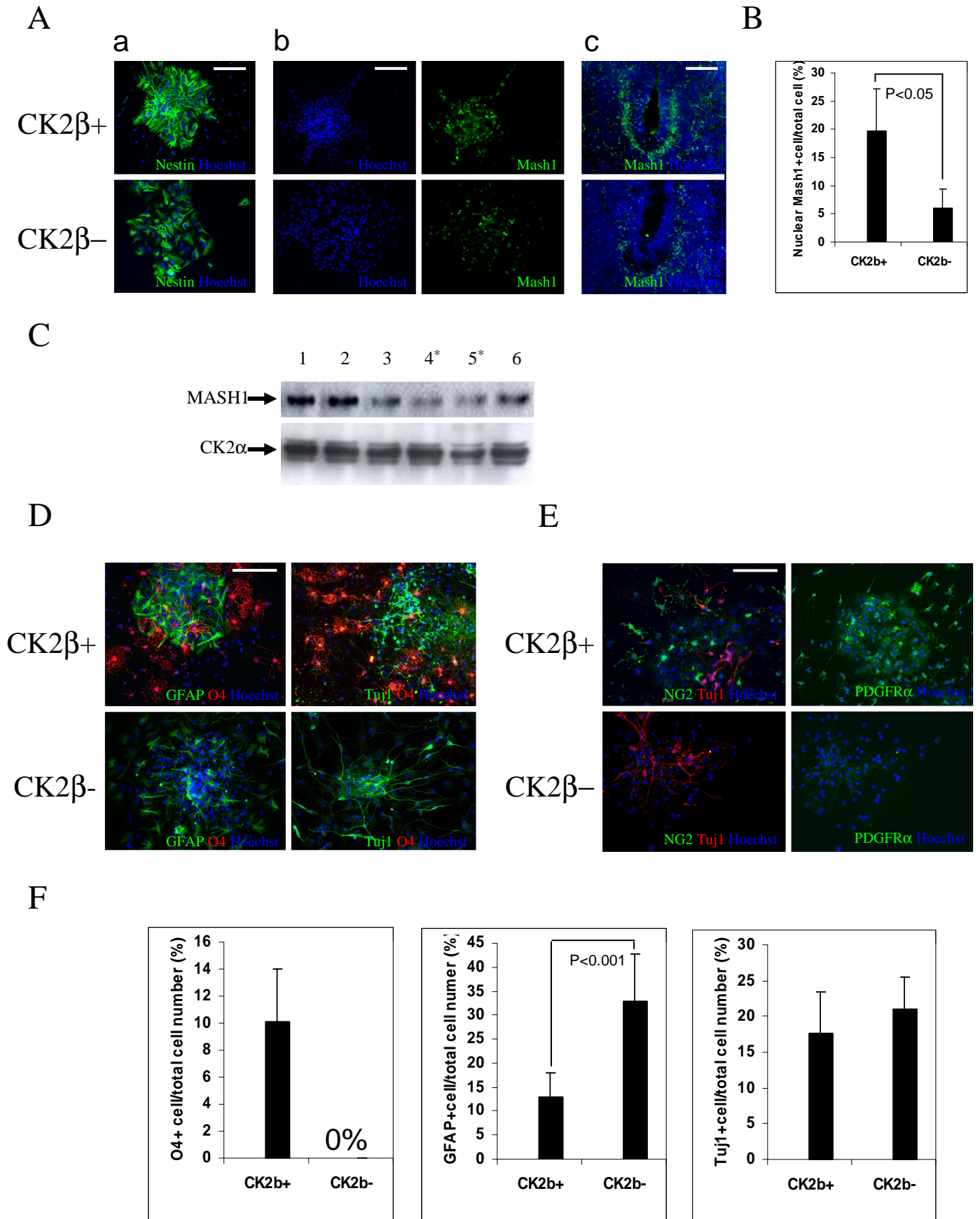


Fig. 4

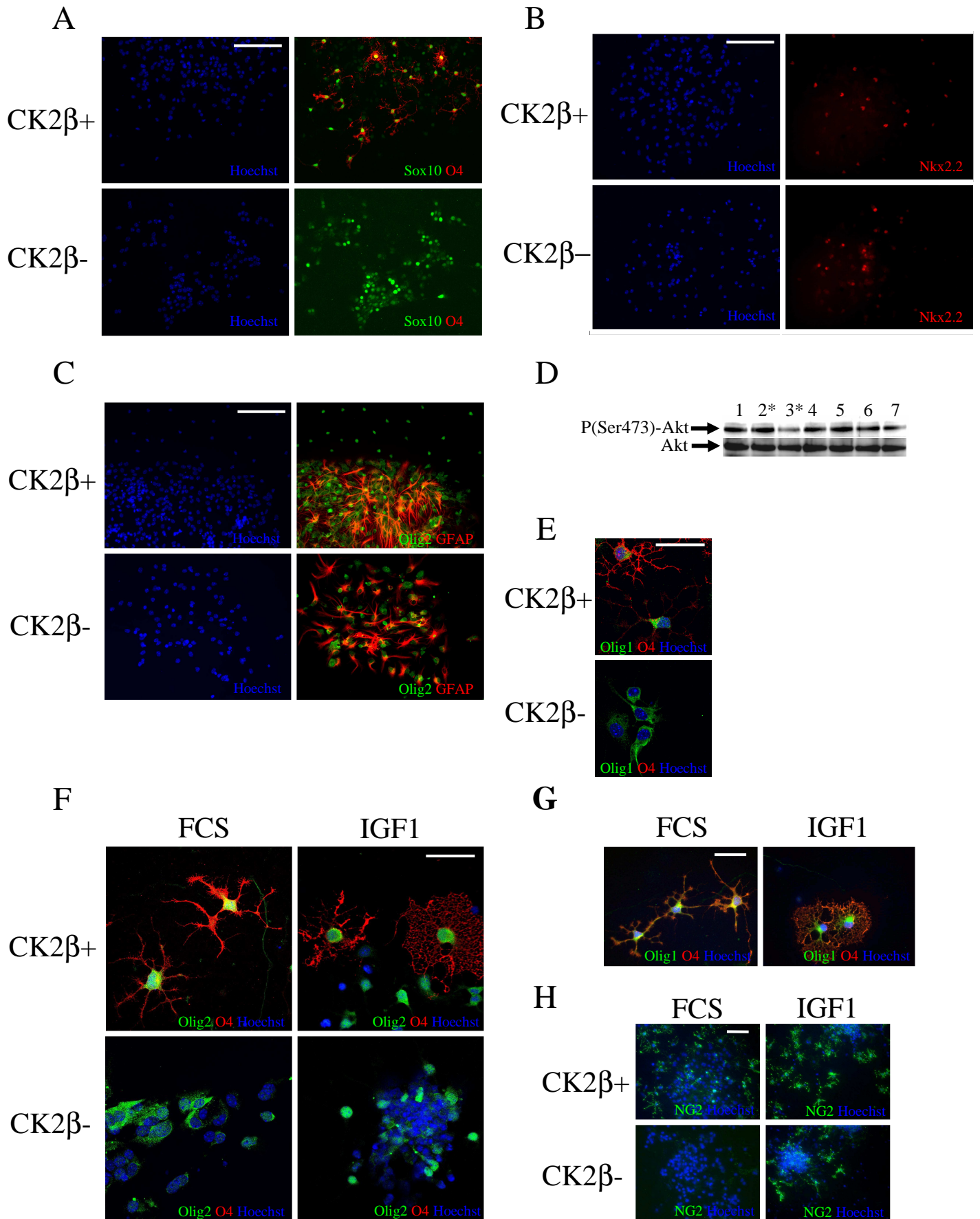


Fig5

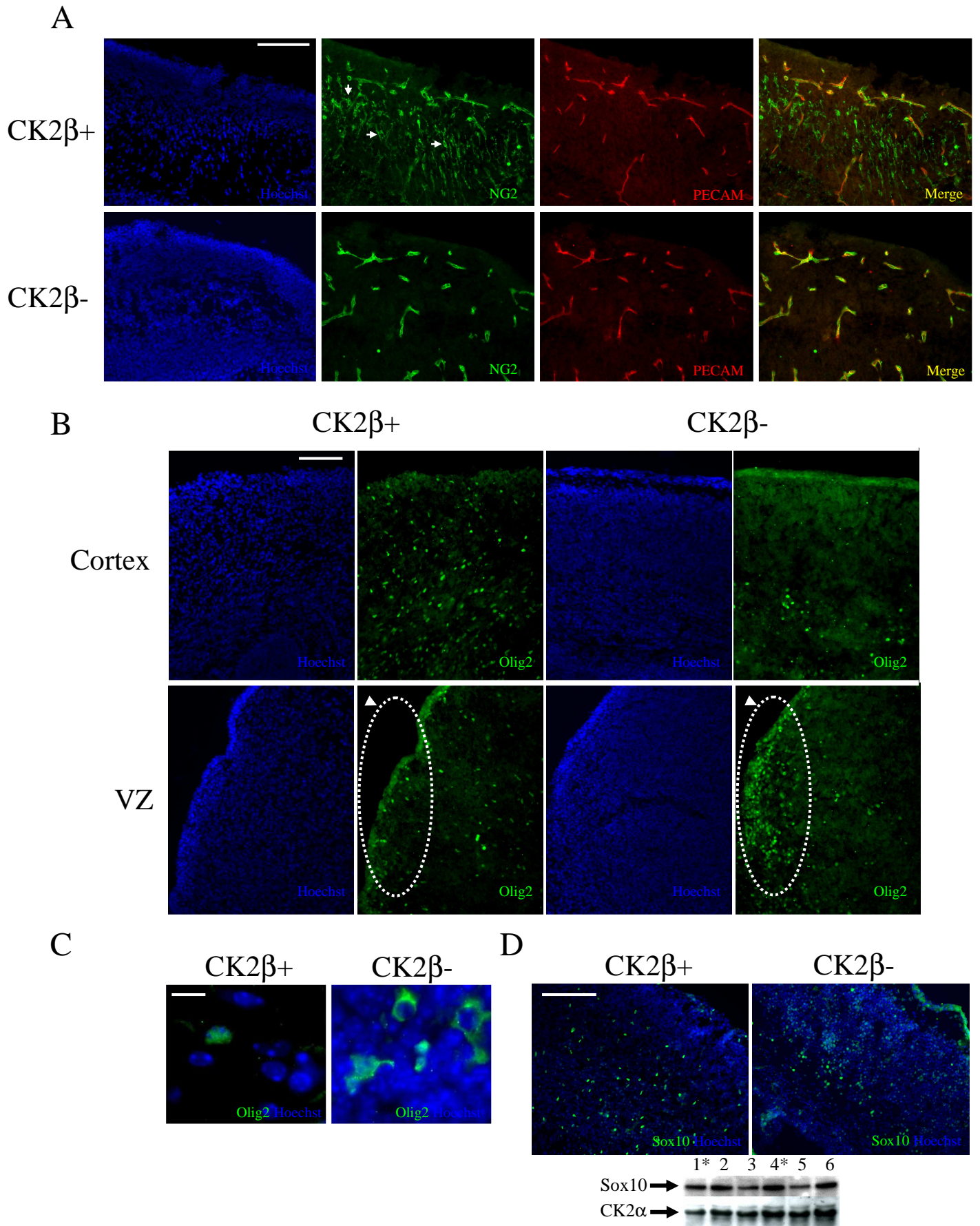


Fig. 6

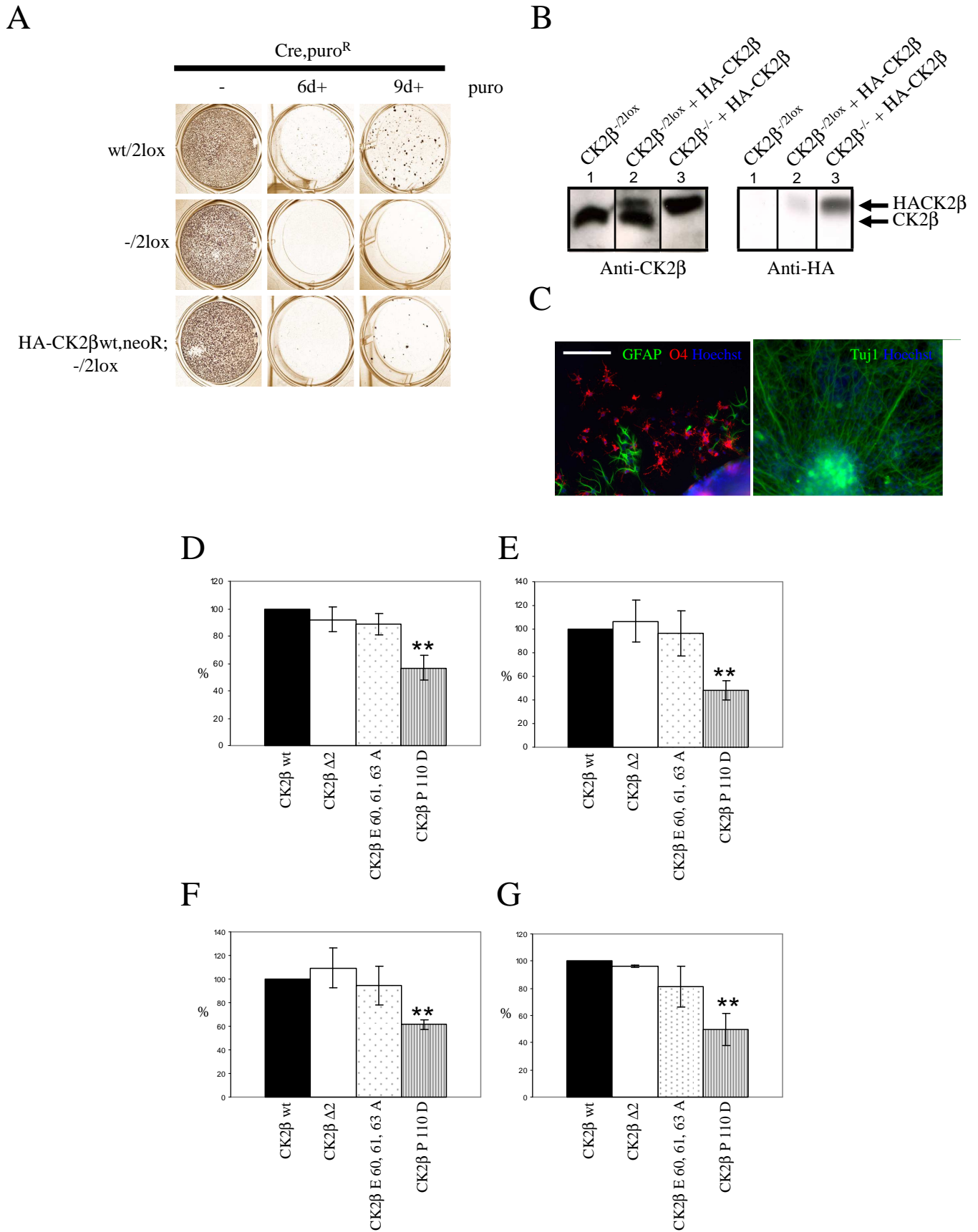


Fig. 7

OLIG1Murin	1	MLRPQR----	-----	-----	-----	-----
OLIG1Human	1	MLRPQR----	-----	-----	-----	-----
OLIG2Murin	1	MDS <u>D</u> ASLVSS	RPSSPEPDDL	FLPARSKGGS	SSGFTGGTVS	SSTP <u>S</u> DCPPE
OLIG2Human	1	MDS <u>D</u> ASLVSS	RPSSPEPDDL	FLPARSKGGS	GSAFTGGTVS	SSTP <u>S</u> DCPPE
OLIG1Murin	7	-----	-----PGDVQ	LGASLYELVG	YRQPPISSSS	-----SS
OLIG1Human	7	-----	-----PGDLQ	LGASLYELVG	YRQPPSSSSS	STSSTSSTSS
OLIG2Murin	51	LSSELRGAMG	ASGAHPGDKL	GGGGFK----	-----SSSSS	TSSSTSSAAT
OLIG2Human	51	LSAELRGAMG	SAGAHPGDKL	GGSGFK----	-----SSSSS	TSSSTSSAAA
			70			
OLIG1Murin	34	SSSTASLLPK	PAREKAEAPL	AEPRGPAPES	GG-----ARA	DAKEEQqQQQ
OLIG1Human	42	SSTTAPLLPK	AAREKPEAP-	AEPGPGPGS	GAHPGGSARP	DAKEEQ-QQQ
OLIG2Murin	92	SSTKKDKKQM	T-----	-----	-----	---EPE-LQQ
OLIG2Human	92	SSTKKDKKQM	T-----	-----	-----	---EPE-LQQ
						108
OLIG1Murin	79	LRRKINSRER	KRMQDLNLAM	DALREVILPY	SAAHCQGAPG	RKLSKIATLL
OLIG1Human	90	LRRKINSRER	KRMQDLNLAM	DALREVILPY	SAAHCQGAPG	RKLSKIATLL
OLIG2Murin	109	LRLKINSRER	KRMHDLNIAM	DGLREVMPYA	HGPSV-----	RKLSKIATLL
OLIG2Human	109	LRLKINSRER	KRMHDLNIAM	DGLREVMPYA	HGPSV-----	RKLSKIATLL
OLIG1Murin	129	LARNYILLIG	SSLQELRRAL	GDG-----	-----	-----
OLIG1Human	140	LARNYILLIG	SSLQELRRAL	GEG-----	-----	-----
OLIG2Murin	154	LARNYILMLT	NSLEEMKRLV	SEIYGGHHAG	FHPSACGGLA	HSAPIPTATA
OLIG2Human	154	LARNYILMLT	NSLEEMKRLV	SEIYGGHHAG	FHPSACGGLA	HSAPLPAATA
				177		
OLIG1Murin	152	-----	-----	-----AGP	AAPRLLLAGL	PLLAAPGSV
OLIG1Human	163	-----	-----	-----AGP	AAPRLLLAGL	PLLAAPGSV
OLIG2Murin	204	HPTRHGAPAA	AAHAAHHPAV	HHPILPPAAA	AAAAAAAAAAA	VSSASLPGSG
OLIG2Human	204	H-----PAA	AAHAAHHPAV	HHPILPPAAA	AAAAAAAAAAA	VSSASLPGSG
OLIG1Murin	175	LLAPGAVGPP	ETLRPtKYLS	LALDEPPCGQ	FSLPAGGAGS	PGL-----
OLIG1Human	186	LLAPGAVGPP	DALRPaKYLS	LALDEPPCGQ	FALPGGGAGG	PGL-----
OLIG2Murin	254	LSSVGSIRPP	HGLLKSPSAA	AAAPLGGG--	----GGGSGG	SGGFQHWGGM
OLIG2Human	248	LPSVGSIRPP	HGLLKSPSAA	AAAPLGGG--	----GGGSGA	SGGFQHWGGM
OLIG1Murin	218	-CSCAVCKFP	HLVPAGLGLA	AVQAQFSK--	--	
OLIG1Human	229	-CTCAVCKFP	HLVPASLGLA	AVQAQFSK--	--	
OLIG2Murin	298	PCPCSMCQVP	PPHHHVSAMG	AGTLPRLTSD	AK	
OLIG2Human	292	PCPCSMCQVP	PPHHHVSAMG	AGSLPRLTSD	AK	

Fig. 8

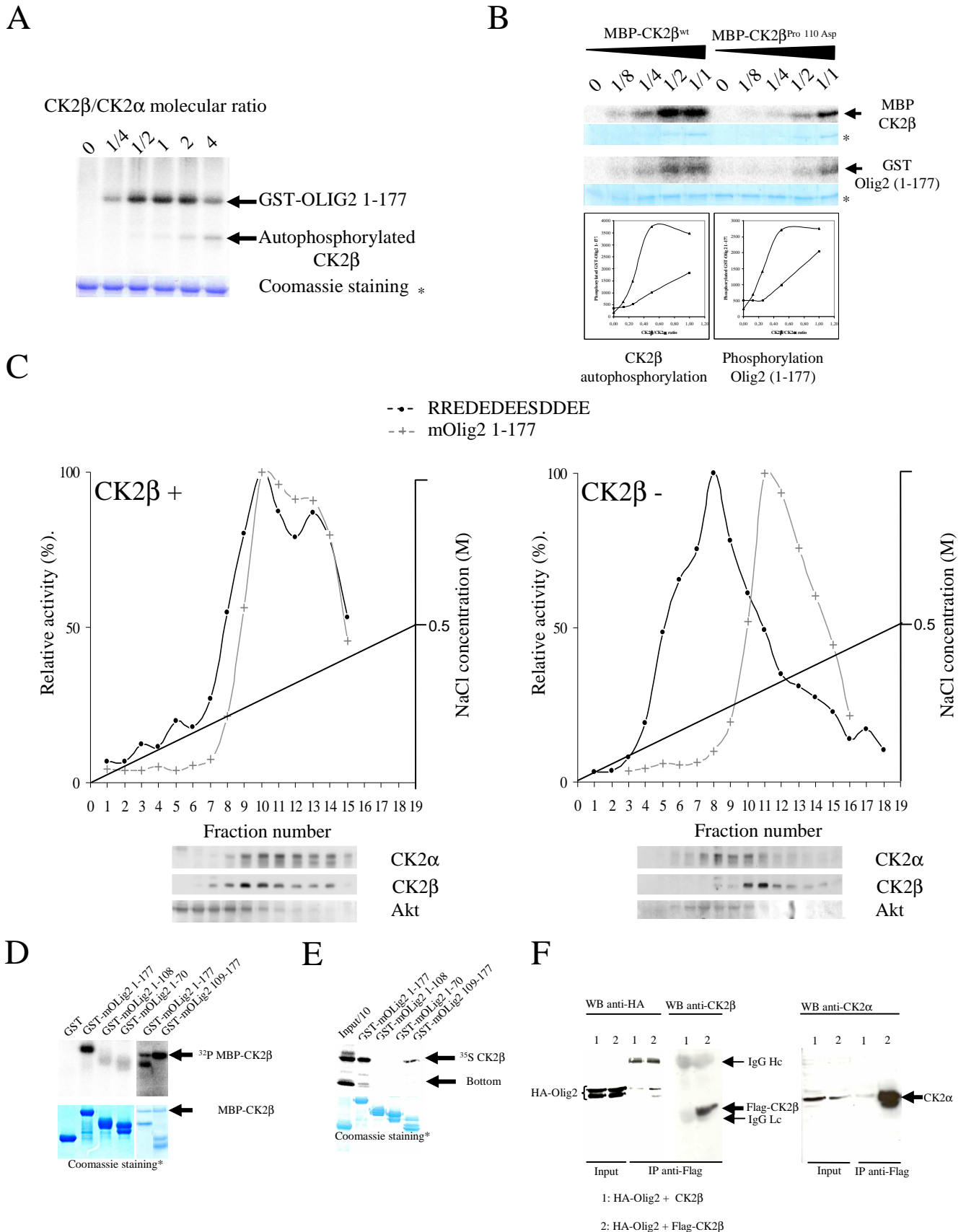
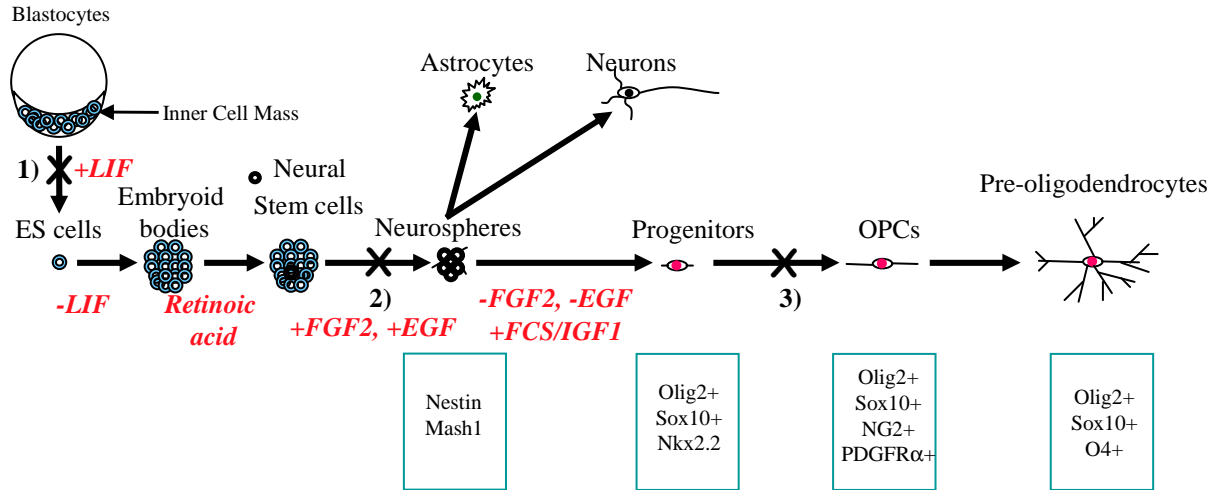


Fig. 9



III.3/ Résultats complémentaires.

Les résultats (obtention de corps embryoides et de neurosphères) sont l'aboutissement de 7 expériences indépendantes. Néanmoins, la différenciation des neurosphères obtenues à partir des cellules souches embryonnaires $CK2\beta^{-/-}$ exprimant la protéine exogène HA- $CK2\beta^{Ser2,3,4Ala}$ ne sont issus que de 3 expériences indépendantes (**figure 39**).

III.3.a Analyses des corps embryoides obtenus à partir des lignées cellulaires $CK2\beta^{-/-}$ exprimant une forme exogène mutante de $CK2\beta$.

L'étude morphologique après coloration hématoxyline/éosine de coupes (10 μ m) de corps embryoides après 8 jours de développement (dont 4 en présence d'acide rétinoïque) n'a révélé aucune différence significative. Néanmoins, une analyse complémentaire par RT-PCR a été réalisée dans le but de déceler des différences phénotypiques plus subtiles et comprendre l'implication de $CK2\beta$ dans la différenciation des cellules ES. L'analyse par RT-PCR, utilisant des amorces spécifiques permettant l'amplification des ARN Brachyury, Bmp4 (marqueurs mésodermiques), HNF4 (endoderme) et Nestin (ectoderme) n'a pu être réalisée, les conditions de PCR n'ayant pu être optimisées. D'autre part, l'utilisation d'amorces spécifiques permettant l'amplification des ARN Sox2 et Melk (marqueurs de cellules souches neurales) n'a révélé aucune différence quantitative (**figure 40**). Ceci suggère que chaque lignée est capable de répondre à l'acide rétinoïque et de générer des précurseurs neuraux de manière similaire.

Une analyse du transcriptome (collaboration avec la plate-forme du génopole de Strasbourg) concernant les cerveaux d'embryons tardifs (E18,5) sauvages et nullizygotés $CK2\beta^{-/-}$ révèle également une expression identique des gènes *Sox2* et *Melk* *in vivo*.

III.3.b/ Différenciation des cellules ES en cellules neurales $CK2\beta^{-/-}$ exprimant les différentes formes mutantes de la protéine exogène HA- $CK2\beta$. (**figure 41**)

La lignée exprimant le mutant de délétion HA- $CK2\beta^{\Delta 2}$ et celle exprimant le mutant HA- $CK2\beta^{Glu60,61,63Ala}$ reconstituant une holoenzyme hyperactive, génèrent des neurosphères dont la pluripotence est au moins égale à celle observée pour les cellules exprimant la forme exogène sauvage. Les cellules migrent à l'extérieur des sphères, et la présence de pré-oligodendrocytes $O4^+$ est facilement détectée (**figure 41**).

Concernant la lignée exprimant le mutant du doigt à zinc HA- $CK2\beta^{Pro110Asp}$, les agrégats cellulaires formés au moment du passage en neurosphères dégèrent très rapidement

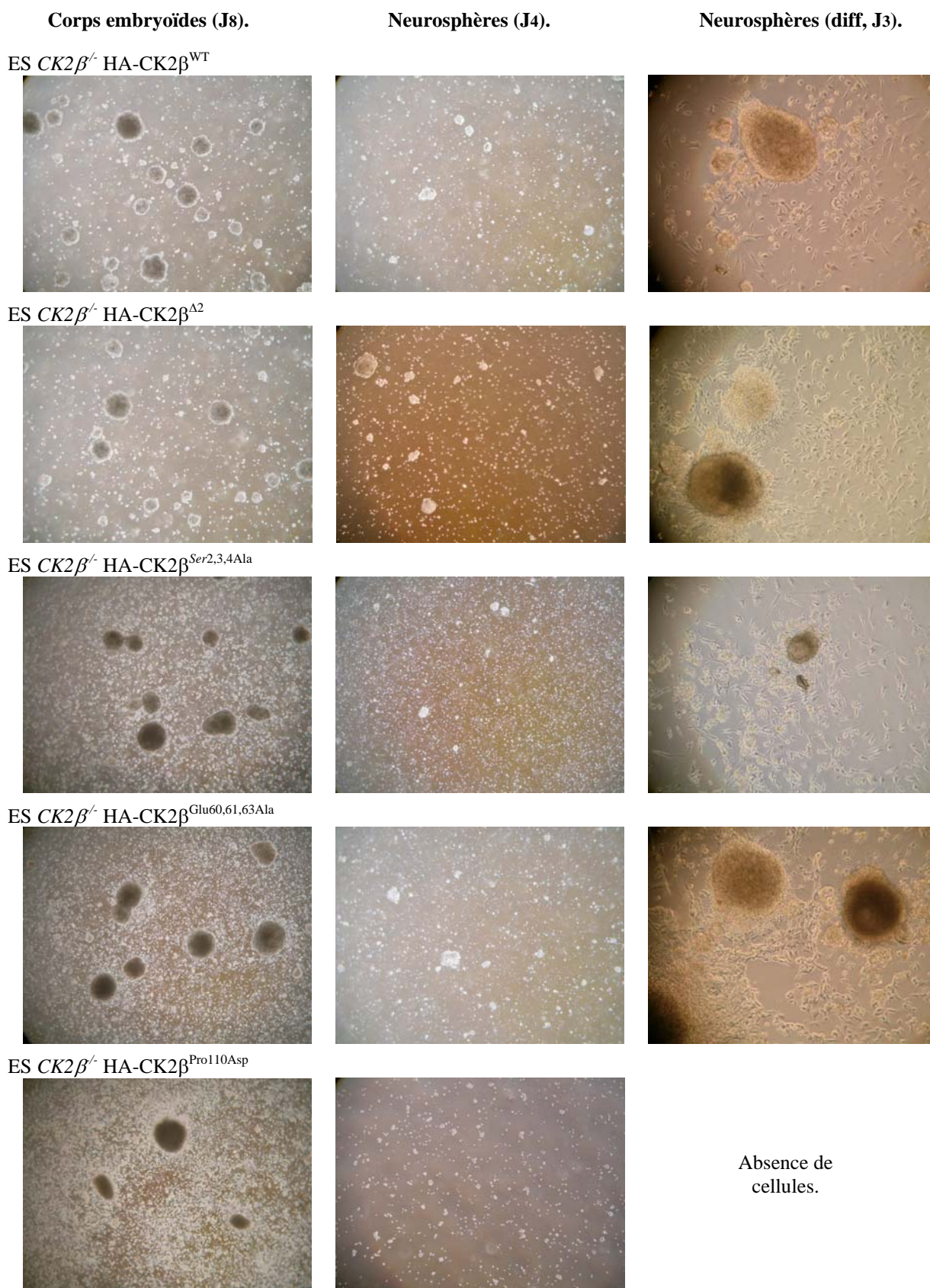


Figure 39: Clichés de microscopie optique des corps embryoides et des neurosphères issus des différentes lignées cellulaires générées.

Les clichés des cellules en différenciation présentent un grossissement d'un facteur 4 par rapport aux autres clichés.

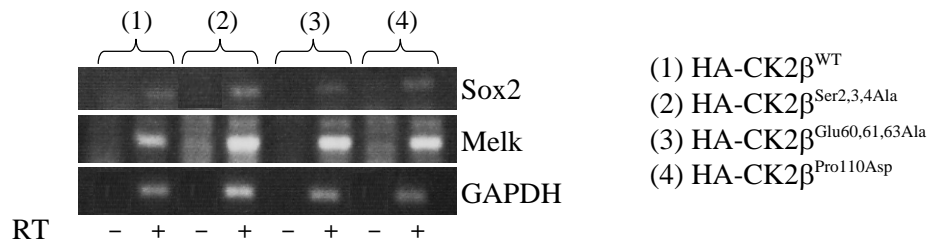
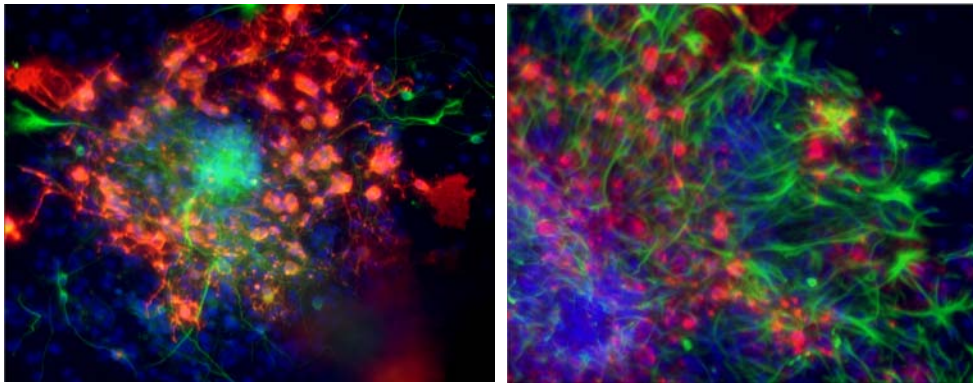


Figure 40 : Analyse semi-quantitative de l'expression de marqueurs neuraux dans des corps embryoides obtenus à partir des différentes lignées de cellules ES CK2 β ^{-/-} exprimant une forme exogène HA-CK2 β .

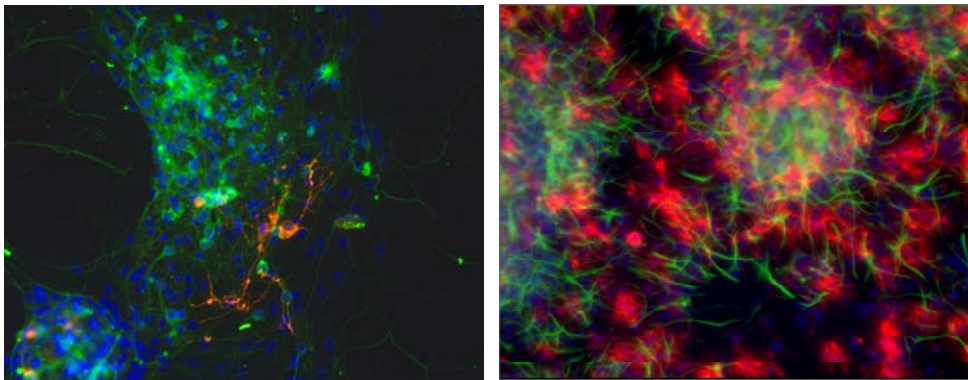
Les analyses par RT-PCR ont été réalisées à partir d'ARN totaux issus de corps embryoides obtenus après 8 jours de différenciation, soit quatre jours après l'addition d'acide rétinoïque. La transcription reverse est réalisée avec 5 μ g d'ARN totaux, selon les conditions préconisées par le fournisseur (InVitrogen, *SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR*). La réaction de PCR est réalisée sur 1 μ L de produit obtenu en présence de polymérase Taq Pharmacia. Les conditions de PCR sont : 94°C 2' / (94°C 1', 58°C 30", 72°C 30") X30 / 72°C 5', 4°C ∞ . Les fragments PCR obtenus sont séparés sur gel d'agarose 1,5%.

ES $CK2\beta^{-/-}$ HA-CK2 β^{WT}

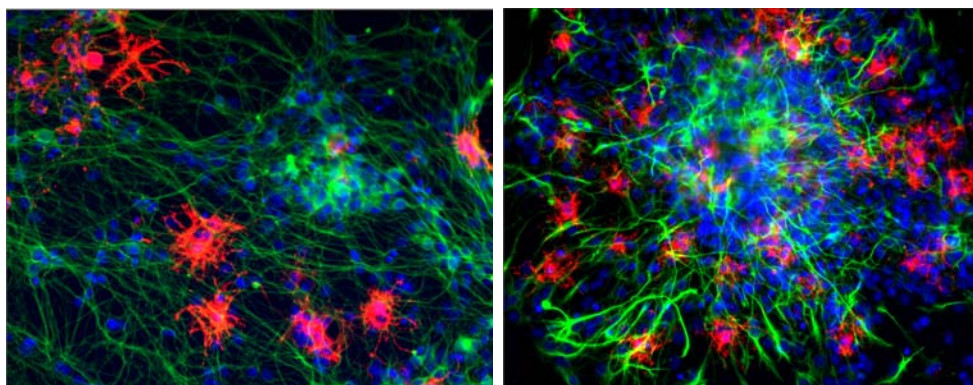
50 μ m



ES $CK2\beta^{-/-}$ HA-CK2 $\beta^{\Delta 2}$



ES $CK2\beta^{-/-}$ HA-CK2 $\beta^{Glu60,61,63Ala}$



O4 - Tuj1 - Hoechst

O4 - GFAP - Hoechst

Figure 41 : Analyse par immunohistochimie de la différenciation des cellules souches neurales issues des cellules souches embryonnaires $CK2\beta^{-/-}$ exprimant la protéine exogène HA-CK2 β^{WT} , HA-CK2 $\beta^{\Delta 2}$ et HA-CK2 $\beta^{Glu60,61,63Ala}$.

Voir la partie matériel et méthodes pour les détails.

(*figure 39*). Ceci suggère une déficience dans l'obtention des sphères à partir des précurseurs neuraux, malgré la détection des marqueurs neuraux réalisée par RT-PCR effectuée sur les corps embryoides (*figure 40*).

Les cellules contenues dans les neurosphères dérivées de la lignée $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Ser2,3,4Ala}$ présentent un défaut de prolifération (*figure 42a*) comparable à celui observé avec la lignée $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Pro110Asp}$ (*figure 6G du manuscrit*). Par contre, les neurosphères issues de cellules ES $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Ser2,3,4Ala}$ n'ont pas fourni de résultats réellement interprétables concernant leur potentiel de différenciation neurale : à partir de 3 expériences de différenciation réalisées, 2 n'ont pas abouties. La 3ème expérience génère des cellules en dégénérescence (noyau picnotique) qui se révèlent être des neurones et des astrocytes ; les cellules $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Ser2,3,4Ala}$ ne semblent pas être capables de se différencier en oligodendrocytes (*figure 42b*). Le phénotype serait donc similaire à celui des neurosphères issues des cerveaux $CK2\beta^{-/-}$. Néanmoins, la validité des résultats n'est pas assurée. Une fois encore, les analyses par RT-PCR effectuées sur les corps embryoides (*figure 40*) ne montrent aucune différence dans l'expression de marqueurs de cellules souches neurales par rapport aux autres lignées.

L'ensemble de ces résultats suggère que seules les formes mutantes de $CK2\beta$ pouvant régénérer une holoenzyme fonctionnelle sont capables de restaurer complètement le phénotype des cellules sauvages.

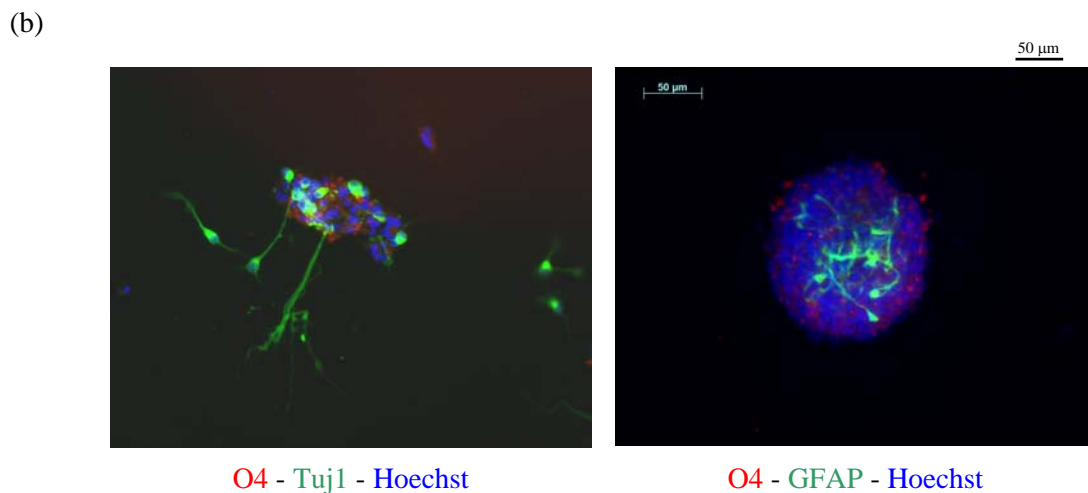
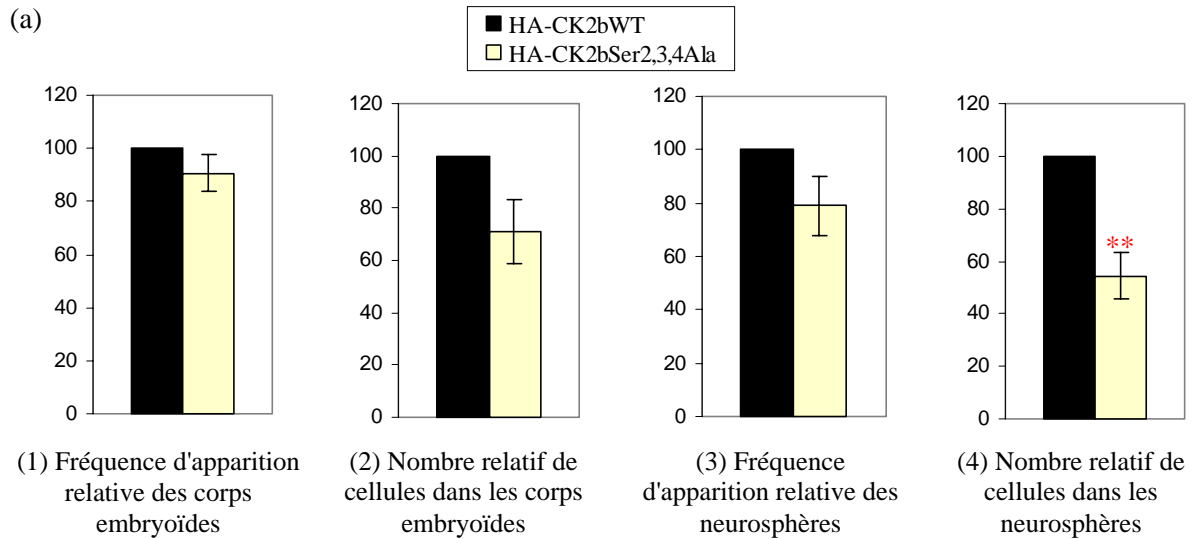


Figure 42 : Différenciation des cellules ES $CK2\beta^{-/-}$ HA-CK2 $\beta^{Ser2,3,4Ala}$ en cellules neurales.

(a) Potentiel des cellules ES $CK2\beta^{-/-}$ HA-CK2 $\beta^{Ser2,3,4Ala}$. La quantification est obtenue après 7 expériences de différenciation *in vitro* indépendantes ; les résultats sont comparés avec ceux des cellules ES $CK2\beta^{-/-}$ exprimant la protéine exogène CK2 β^{WT} (reportés comme 100% dans chaque expérience indépendante). Les corps embryoides sont obtenus en présence d'acide rétinoïque et en absence de LIF, les neurosphères en présence de bFGF et de EGF à partir des cellules issues de la dissociation des corps embryoides. La numération cellulaire est effectuée après dissociation des corps embryoides ou des neurosphères.

(**, test de Student : $P < 0.001$).

(b) Analyse par immunohistochimie de la différenciation des cellules souches neurales issues des cellules ES $CK2\beta^{-/-}$ exprimant la protéine exogène HA-CK2 $\beta^{Ser2,3,4Ala}$. La présence de signal correspondant au marqueur O4 est due au « bruit de fond » de l'immunofluorescence.

III.3.c/ Génération de tératocarcinomes à partir des cellules ES $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{\Delta 2}$.

Les résultats obtenus (*manuscrit en préparation*) montrent que la lignée exprimant le mutant HA- $CK2\beta^{\Delta 2}$ se comporte de façon similaire à celle exprimant la forme exogène sauvage de la protéine. Cette forme tronquée des 2 résidus C-terminaux de la protéine, retrouvée dans les cellules tumorales, est le résultat d'une protéolyse de la protéine (Filhol, *résultats non publiés*). Chez les mammifères, la sérine 209 est phosphorylée par p34^{cdc2} pendant la mitose (Litchfield, 1991, 1992), mais on ignore l'impact de cette modification. Le mutant de délétion $CK2\beta^{\Delta 2}$ ne subit plus cette modification (Filhol, *résultats non publiés*).

Afin de mieux comprendre l'implication de ce mutant dans la cancérogenèse, les cellules ES $CK2\beta^{-/-}$ exprimant la forme exogène HA- $CK2\beta^{\Delta 2}$ ont été injectées sous la peau de souris immunocompétentes ; leur capacité à générer des tératocarcinomes (tumeurs bénignes différenciées) est comparée à celle des cellules ES $CK2\beta^{-/-}$ exprimant la forme sauvage HA- $CK2\beta^{WT}$. Ces expériences d'induction de tératocarcinomes suggèrent que la forme tronquée $CK2\beta^{\Delta 2}$ apparaît dans les cellules cancéreuses une fois le phénotype tumoral acquis. En effet, il n'y a pas de différence significative dans la fréquence d'apparition des tumeurs issues des ES nullizygotés exprimant la protéine HA- $CK2\beta^{WT}$ et celles issues des ES $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{\Delta 2}$ (**figure 43**). De plus, la présence de la protéine tronquée ne favorise pas la prolifération des cellules *in vivo* comme l'atteste la masse des tumeurs. Ceci concorde avec les études *in vitro* réalisées sur les cellules souches embryonnaires (**figure 37**). Enfin, l'étude histologique des tératocarcinomes obtenus ne montre aucune singularité.

L'ensemble des résultats suggèrent que la forme $CK2\beta^{\Delta 2}$ remplit les fonctions essentielles de la protéine sauvage, et que cette forme tronquée serait une conséquence du processus cancéreux, et donc un marqueur de cette pathologie plutôt qu'une cause. Le développement d'un anticorps permettant de reconnaître cette forme tronquée pourrait se révéler être un outil de choix dans des études pronostic. Des études plus poussées sont également nécessaires afin d'évaluer l'impact de cette forme $CK2\beta^{\Delta 2}$ sur la fonction de l'holoenzyme, ainsi qu'une éventuelle corrélation de son apparition avec le grade des tumeurs humaines.

Souris	Poids de la tumeur (mg)	
	WT	$\Delta 2$
1	30	27
2	55	28
3	153	78
4	0	44
5	231	184
6	45	275
7	20	280
8	80	431
9	256	123
10	123	0
11	358	180
12	15	41
13	0	10
14	0	135
15	166	0
16	112	0
17	0	50

	<i>CK2β^{-/-}</i> HA-CK2 β ^{WT}	<i>CK2β^{-/-}</i> HA-CK2 β ^{$\Delta 2$}
Fréquence d'apparition	70,6 %	82,4 %
Poids moyen	126,5 mg	134,7 mg

Figure 43 : Induction de tératocarcinomes à partir de cellules souches embryonnaires *CK2 β ^{-/-}* HA-CK2 β ^{$\Delta 2$} .

20 souris 129/SvPas@Ico ont été utilisées, dont 3 qui n'ont pas développé de tumeurs.

(voir matériel et méthodes pour les détails)

.DISCUSSION.

I/ Implication de la protéine CK2 β dans la biologie des cellules souches.

Au cours de ce travail, la génération de lignées cellulaires ES murines conditionnelles pour le gène *CK2 β* (cellules *CK2 β 2lox/-*) qui expriment de façon stable une forme exogène de la sous-unité régulatrice CK2 β de la protéine kinase CK2 a permis d'obtenir un modèle cellulaire de mort induite et de restauration de la viabilité cellulaire après introduction de la recombinase Cre du bactériophage P1. Ce modèle est unique et représente un outil de choix pour étudier la protéine CK2 β dans un contexte cellulaire. En effet, la surexpression stable de la protéine CK2 β étant impossible (Buchou, *résultats non publiés*), l'utilisation d'un dominant-négatif est exclue. D'autre part, seule l'invalidation complète du gène endogène permet l'expression significative de la forme exogène (*figure 35d*).

Les données structurales et biochimiques actuelles permettent une mutagenèse fine de la protéine CK2 β . Tous les mutants choisis pour cette étude permettent la restauration de la viabilité des cellules CK2 $\beta^{-/-}$; il semblerait donc qu'aucun domaine fonctionnel *in vitro* étudié ne soit impliqué dans la survie des cellules ES. Alternativement, de faibles niveaux d'holoenzyme active, y compris celles générées avec les divers mutants de CK2 β , peuvent se révéler suffisants pour assurer les fonctions essentielles dans les cellules ES.

Ces résultats, notamment ceux concernant les mutants CK2 $\beta^{Ser2,3,4Ala}$ et CK2 $\beta^{Pro110Asp}$, soulèvent plusieurs interrogations. L'absence de protéine CK2 β est létale pour les cellules ES. Le mutant affectant les sites d'autophosphorylation, CK2 $\beta^{Ser2,3,4Ala}$, qui ne restaure pas la viabilité chez la Drosophile (Jauch, 2002), suffit à rétablir la viabilité des cellules ES. La présence du mutant CK2 $\beta^{Pro110Asp}$, relatif au domaine en doigt de zinc à l'interface du dimère CK2 β_2 et générant une holoenzyme qui se comporte de façon similaire à la sous-unité catalytique seule (Filhol, 2004a) permet également cette restauration de la viabilité cellulaire. Néanmoins, l'effet de la mutation est partiel *in vitro* et son intensité dépend du substrat β -dépendant étudié (Filhol, 2004a). La restauration de la survie cellulaire des ES CK2 $\beta^{-/-}$ par le mutant CK2 $\beta^{Pro110Asp}$ peut être expliquée par le fait que l'activité CK2 β -dépendante, bien que minime, est suffisante pour la survie des cellules ES (Blond, 2005).

La survie et la prolifération des cellules ES, strictement dépendante de la présence de CK2 β , pourrait éventuellement être liée à un partenaire (inconnu ?) de cette sous-unité, autre que la sous-unité catalytique CK2 α . L'expérience d'invalidation conditionnelle et restauration de la viabilité devra être réalisée sur les cellules ES CK2 $\beta^{2lox/-}$ exprimant un mutant ciblant le domaine d'interaction entre le dimère CK2 β_2 et les sous-unités catalytiques CK2 α . La

génération de cellules hétérozygotes conditionnelles exprimant un mutant n'interagissant plus avec les sous-unités catalytiques ($CK2\beta^{Met166/Tyr188/Phe190\rightarrow Ala}$, Laudet, 2007) pourrait permettre d'obtenir des résultats clarifiant ces observations.

Les cellules ES nullizygotés $CK2\beta^{-/-}$ exprimant le mutant $CK2\beta^{\Delta 2}$ ou $CK2\beta^{Glu60,61,63Ala}$ se comportent de façon similaire aux cellules $CK2\beta^{-/-}$ exprimant la forme sauvage exogène. Les neurosphères $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{\Delta 2}$ et $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Glu60,61,63Ala}$ sont capables au même titre que leur équivalent « sauvage » de produire des oligodendrocytes $O4^+$. Néanmoins, les mutants $CK2\beta^{Ser2,3,4Ala}$ et $CK2\beta^{Pro110Asp}$ ont rapidement montré leurs limites quant au potentiel de différenciation des cellules ES. La protéine CK2 est responsable d'une large fraction du phosphoprotéome et la sous-unité CK2 β module la phosphorylation de centaines de substrats. Son absence a donc des répercussions non négligeables sur l'équilibre des voies de signalisation. La différenciation des cellules ES en cellules souches neurales a démontré que la protéine CK2 β est impliquée dans la balance des voies de signalisation contrôlant leur auto-renouvellement, leur prolifération et leur différenciation. Ces résultats prennent toute leur valeur quand on les intègre à l'étude du rôle de CK2 β dans les cellules souches neurales menée *in vivo*.

La protéine CK2 β , sous-unité régulatrice de la protéine kinase CK2, est nécessaire pour la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches neurales dans le cerveau murin. C'est la première démonstration d'une fonction de la protéine dans le maintien de la prolifération cellulaire chez les mammifères *in vivo*. Chez la Drosophile, la protéine jouerait un rôle dans prolifération ou la survie des cellules de Kenyon pendant le développement cérébral (Jauch, 2002). Chez la souris, l'absence de la protéine résulte en une diminution du nombre de cellules en cycle dans les zones germinales embryonnaires tel que le gyrus dente de l'hippocampe et la zone ventriculaire des ventricules latéraux. L'abolition de l'expression de CK2 β n'a aucun effet sur le nombre de neurosphères répondant à EGF/bFGF dérivées de la dissection du télencéphale à E18.5. Par contre, le taux de la prolifération des cellules souches neurales nullizygotés *in vitro* est fortement réduit et CK2 β est nécessaire à la génération de neurosphères secondaires. Il apparaît donc que l'absence de la protéine affecte le maintien des cellules souches neurales murines mais pas leur génération.

Les cellules $CK2\beta^{-/-}$ exprimant le mutant $CK2\beta^{Pro110Asp}$ sont largement déficientes dans leur capacité à produire des corps embryoides et des neurosphères. Ces résultats ne sont pas en accord avec les résultats obtenus à partir des cellules souches neurales $CK2\beta^{-/-}$ issues du télencéphale embryonnaire à E18.5, qui sont incapables de proliférer et de s'auto-renouveler. Cette différence peut encore une fois être expliqué par l'effet partiel de la mutation Pro110Asp.

Cependant, la forte diminution du nombre de cellules produites par les cellules ES $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Pro110Asp}$ lors de la différenciation neurale peut être corrélé avec le défaut de la prolifération décrit pour les cellules souches neurales $CK2\beta^{-/-}$. Les tentatives répétées d'étude du potentiel de différenciation des neurosphères $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Pro110Asp}$ ont échoué, principalement à cause d'un défaut d'attachement des neurosphères sur les lamelles traitées à la poly-L-lysine.

L'ensemble des résultats des expériences réalisées *in vitro* à l'aide du modèle des ES suggère que $CK2\beta$ est impliquée dans les fonctions neurales, notamment dans le processus oligodendroglial, à travers la régulation positive de l'activité de la sous-unité catalytique $CK2\alpha$. La protéine kinase CK2 est fréquemment hyper-active dans le cas de cancers humains et dans les tissus normaux hautement prolifératifs (Olsten & Litchfield, 2004). Il reste cependant à rechercher les substrats strictement β -dépendants impliqués dans l'augmentation de la prolifération cellulaire et/ou de la tumorigenèse ainsi que dans l'oligodendrogenèse.

Enfin, une implication supplémentaire de la protéine $CK2\beta$ dans la biologie des cellules souches a été mise en évidence par l'étude *in vivo*. La protéine semble être impliquée dans le phénomène de migration nucléaire intra-mitotique des cellules souches neurales de la glie radiaires (voir l'article, figure 2A). Une étude complète devra être menée afin d'appréhender le rôle exact de la protéine dans ce processus.

II/ Validité du modèle ?

L'ensemble des expériences effectuées soulève un certain nombre de contraintes techniques qu'il est nécessaire d'améliorer pour assurer l'efficacité du modèle cellulaire et la pertinence des résultats.

II.1/ Efficacité de l'invalidation conditionnelle.

La génération de lignées cellulaires exprimant exclusivement une forme mutante de CK2 β nécessite d'amplifier un grand nombre de clones résistants aux agents de sélection afin d'en vérifier le génotype. En effet, l'invalidation du gène conditionnel a lieu en moyenne dans moins de 10 % des cas. Le système pMSCV (Clontech) permet d'exprimer le gène d'intérêt (recombinase Cre dans pMSCV-Puro^R) sous contrôle d'un promoteur rétroviral modifié, spécialement amélioré de façon à ce que les facteurs répresseurs des cellules ES soient inopérants. La faible efficacité de l'invalidation conditionnelle peut s'expliquer par le fait que les ADNc correspondant à la recombinaison et à la cassette de sélection ne sont pas soumis au contrôle d'un même promoteur.

Il faut noter qu'un problème similaire se pose lors de la génération des cellules hétérozygotes conditionnelles CK2 $\beta^{lox/-}$ exprimant une forme exogène de la protéine CK2 β (système pMSCV-Neo^R). En effet, il est nécessaire de s'assurer que la protéine exogène est bien et bien exprimée avant de procéder aux essais d'invalidation du gène endogène conditionnel. Il s'agit en effet de garantir que l'éventuelle mort cellulaire éventuellement observée est due au défaut fonctionnel du mutant exprimé et non pas à l'absence de protéine exogène. Ceci sous-entend donc l'amplification d'une douzaine de clones pour vérifier le niveau d'expression de la protéine exogène. L'expérience d'invalidation conditionnelle est ensuite réalisée à partir du clone présentant le plus fort taux d'expression du mutant étudié.

Enfin, le dernier paramètre en jeu est le mode de sélection des clones. Il est basé sur le critère morphologique des cellules ES (colonie ronde et réfringente, signe d'une bonne conservation de la multipotence) ayant été soumises aux expériences d'invalidation conditionnelle, il est subjectif. Pour illustrer ce point, il suffit d'explicitier les résultats obtenus (**figure 36**). Lors des expériences réalisées avec les cellules ES CK2 $\beta^{-/-}$ HA-CK2 β^{WT} , CK2 $\beta^{-/-}$ HA-CK2 $\beta^{\Delta 2}$ et CK2 $\beta^{-/-}$ HA-CK2 $\beta^{Glu60,61,63Ala}$, seules les colonies répondant au mieux au critère morphologique étaient sélectionnées. Il en résulte une efficacité du modèle de 5,4% en moyenne. Pour les expériences réalisées avec les cellules ES CK2 $\beta^{-/-}$ HA-CK2 $\beta^{Ser2,3,4Ala}$ et CK2 $\beta^{-/-}$ HA-CK2 $\beta^{Pro110Asp}$, si la majorité des colonies repiquées répondaient strictement au

critère morphologique, environ 1/3 des colonies sélectionnées présentaient une morphologie moins « indifférenciée » au moment de la sélection. L'efficacité du modèle est alors de 14,5% en moyenne, soit quasiment multipliée par 3.

La question de la validité des cellules sélectionnées se pose alors : le défaut de potentiel de différenciation des cellules ES $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Ser2,3,4Ala}$ et $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Pro110Asp}$ serait-il dû à la qualité intrinsèque des cellules ES sélectionnées ?

II.2/ Qualité de la différenciation neurale à partir des corps embryoides.

Si la différenciation neurale des cellules ES parentales $CK2\beta^{2lox/-}$ fut relativement aisée à obtenir et à reproduire, des difficultés sont rapidement apparues pour les lignées cellulaires nullizygotés « restaurées » par l'expression d'une protéine $CK2\beta$ exogène. Malgré 2 infections rétrovirales (expression de la protéine puis invalidation conditionnelle du gène endogène), les cellules « restaurées » $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{WT}$ sont capables de se différencier de façon multipotente. Elles ont donc conservé leur potentiel de différenciation, essentiel à la poursuite de l'étude fonctionnelle de la protéine $CK2\beta$. Les expériences de différenciation des lignées mutantes ont été plus difficiles à réaliser.

Néanmoins, les résultats obtenus avec les lignées ES $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{\Delta 2}$ et $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Glu60,61,63Ala}$, $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Pro110Asp}$ sont convaincants. Les résultats obtenus avec la lignée $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Ser2,3,4Ala}$ sont par contre insuffisamment reproductifs et à prendre avec réserve.

Il faudrait à l'avenir optimiser le protocole de différenciation afin de pouvoir réaliser une étude quantitative complète. *In vivo*, l'invalidation du gène $CK2\beta$ abolit complètement la génération d'OPCs $NG2^+$ $O4^+$. Le système cellulaire utilisé au cours de ce travail est donc qualitativement concluant vis à vis de l'activité des divers types d'holoenzyme générée. L'étude quantitative a été effectuée pour la prolifération des cellules lors du processus de différenciation, mais l'apparition de cellules $O4^+$ suite à la transgénèse additionnelle de formes mutantes n'a pu être quantifiée selon le mutant exprimé.

Les neurosphères issues des cellules ES « restaurées » ne récapitulent pas entièrement le comportement des neurosphères issues des cerveaux embryonnaires à E18,5. Les cellules ES parentales ($CK2\beta^{2lox/-}$) présentent un comportement plus proche des cellules souches neurales purifiées : les neurosphères sont nombreuses et la différenciation très similaire. Les cellules ES « restaurées » ont subi deux infections rétrovirales successives qui a nécessité deux étapes de sélection clonale supplémentaires. Les événements épigénétiques, essentiels à l'identité

cellulaire, sont susceptibles d'avoir été perturbés. La qualité des neurosphères issues des cellules ES « restaurées » n'est pas la même que celle des neurosphères générées par les cellules souches neurales. Cependant, les expériences ont été réalisées plusieurs fois et les résultats ont donc une pertinence statistique.

La qualité intrinsèque des cellules ES est primordiale à l'efficacité de la différenciation neuronale. En effet, il semblerait que le nombre de passage des cellules ES utilisées doit être minimisé (Brustle, 1999 : moins de 20 passages). Or, le protocole d'obtention des cellules « restaurées », qui consiste en deux infections rétrovirales, et l'amplification nécessaire des cellules conduit à dépasser cette limite. La génération des cellules ES $CK2\beta^{2lox/-}$ a déjà nécessité quatre étapes de sélection clonale (Buchou, 2003).

Qualitativement, les cellules ES $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{WT}$, $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{\Delta 2}$ et $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Glu60,61,63Ala}$ sont capables de restaurer l'oligodendrogenèse déficiente chez les cellules souches neurales $CK2\beta^{-/-}$. Mais des analyses quantitatives semblent difficiles en l'état actuel de rendement du protocole de différenciation. En ensemencant $30 \cdot 10^6$ cellules ES pour générer des corps embryoïdes (à raison de $1,5 \cdot 10^6$ cellules ES par boîte de pétri de 10 cm, voir matériel et méthodes), on obtient $2 \cdot 10^5$ cellules après dissociation des neurosphères. Sur ce nombre, seule une très faible proportion de cellules, les cellules souches neurales (moins de 10%), survivra au passage des neurosphères en milieu de différenciation. Pour réaliser une étude immunohistologique quantitative, il faudrait initier le protocole de différenciation avec plus de $100 \cdot 10^6$ cellules ES par lignée cellulaire (soit plus de 65 boîtes de pétri de 10 cm de diamètre). Il apparaît nécessaire d'optimiser chaque étape du protocole de différenciation si l'on souhaite pouvoir procéder à des études quantitatives.

La question du critère pris en compte pour l'analyse quantitative se pose une nouvelle fois. Le comptage du nombre de neurosphères obtenues pour chaque lignée cellulaire étant visuel, les agrégats cellulaires obtenus, notamment avec les cellules ES $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Ser2,3,4Ala}$ et $CK2\beta^{-/-}$ HA- $CK2\beta^{Pro110Asp}$, sont-ils réellement des neurosphères ? La létalité observée lors du passage en conditions de différenciation pourrait être expliquée par une absence de cellules souches neurales au sein de ces agrégats semblables aux neurosphères. Il est donc nécessaire d'étudier l'expression du marqueur nestine dans ces agrégats afin de vérifier s'ils sont bien des neurosphères.

Afin de promouvoir la différenciation des cellules ES en cellules neurales, les corps embryoïdes ont été cultivés 8 jours, dont 4 en présence d'acide rétinoïque. Les cellules ont ensuite été dissociées et cultivées dans un milieu sans sérum décrit pour sélectionner les

cellules souches neurales, en présence des facteurs de croissance FGF2 et EGF, essentiels à la prolifération des cellules souches neurales (Gage, 1995 ; Gritti, 1996 ; Reynolds, 1992 ; Reynolds & Weiss, 1996).

L'utilisation de PDGF pourrait être intéressante car ce facteur de croissance augmente la proportion de cellules gliales obtenue à partir de cellules ES (McKay, 1997 ; Brustle, 1999), stimule la prolifération des OPCs (Barres, 1993 ; Woodruff, 2004) et des cellules souches neurales *in vivo* (Jackson, 2006). L'emploi de LIF pourrait également être utile. En effet, la cytokine favorise non seulement l'auto-renouvellement des cellules souches neurales (Bauer & Patterson, 2006), mais également la survie des oligodendrocytes (Barres, 1993 ; Azari, 2006). Les membres de la famille des IGFs ainsi que l'interleukine 6 soutiennent également la survie des oligodendrocytes (Barres, 1993). De plus, l'addition d'IL-6 dans le milieu de culture des neurosphères issues de cellules ES augmente l'efficacité de la différenciation des cellules souches neurales en OPCs (Zhang, 2004). Un inhibiteur de protéines kinases à large spectre, la staurosporine, pourrait également être utilisé. A faible dose, afin de limiter sa toxicité, la staurosporine induit la génération de neurosphères multipotentes répondant à l'EGF et capables d'engendrer des neurosphères secondaires, à partir de cellules ES (Schumacher, 2003). Néanmoins, son effet neurogénique est à prendre en compte au moment de la différenciation des cellules souches neurales (Schumacher, 2003). Enfin, un facteur diffusible, dérivé des neurosphères, la cystatin C, peut doubler la quantité de cellules souches neurales obtenues à partir de cellules ES (Kato, 2006). Cet inhibiteur des protéases à cystéine est produit par les astrocytes dans le cerveau adulte (Hasegawa, 2007). Il augmente le nombre de neurosphères obtenues à partir du cerveau embryonnaire et le nombre de cellules GFAP⁺ et de cellules Nestin⁺, donc le nombre de cellules souches / progénitrices. Par contre, il favorise la différenciation astrocytaire au détriment de l'oligodendrogenèse, et son effet est indépendant de son activité anti-protéasique (Hasegawa, 2007).

L'amélioration du protocole de différenciation pourrait donc passer par l'utilisation de différents facteurs exogènes, le but étant d'augmenter l'efficacité de rendement (plus de neurosphères) et la survie cellulaire tout au long du protocole. Il s'agira de tester différentes combinaisons utilisant un ou plusieurs facteurs décrits ci-dessus (**figure 44**).

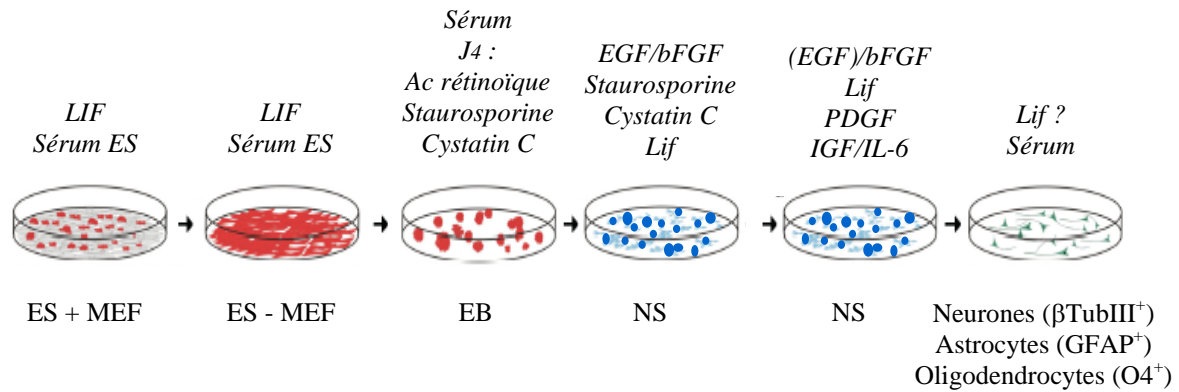


Figure 44 : Améliorations proposées du protocole de différenciation neurale des cellules ES.

Le schéma récapitule l'ensemble des facteurs éventuellement utilisés pour chaque étape du protocole. Après génération des corps embryoides (EB), cultivés 4 jours sans facteur de différenciation, puis 4 jours en présence d'acide rétinolique, staurosporine et cystatin C, les cellules sont individualisées et réensemencées dans de nouvelles conditions de culture afin d'obtenir des neurosphères (NS). Les cellules des neurosphères sont ensuite individualisées et ré-ensemencées afin de générer des neurosphères, en présence de facteurs favorisant la survie des cellules progénitrices, et notamment des OPCs, plus difficiles à obtenir avec le protocole actuel. Enfin, les neurosphères sont ensemencées sur poly-L-lysine en présence de sérum, éventuellement de LIF, afin d'induire leur différenciation en cellules des 3 lignages neurales majoritaires du système nerveux central.

MEF : *Murin Embryonic Fibroblasts* ; cellules nourricières.

III/ Perspectives.

La balance prolifération - apoptose - différenciation est essentielle pour l'homéostasie des tous les tissus. La compréhension des voies de signalisation touchées lors du déséquilibre de cette balance apparaît donc comme fondamentale. Au cœur d'une tumeur se trouve une petite population de cellules peu différenciées, relativement quiescentes, et à l'origine de la tumeur. L'espoir actuel est d'améliorer les thérapies anti-cancéreuses en éliminant cette population de cellules souches cancéreuses par leur destruction sélective. La connaissance des processus indispensables à la prolifération et à la différenciation des cellules souches est donc primordiale pour rechercher de nouvelles molécules thérapeutiques.

Concernant le système nerveux central, la présence de précurseurs oligodendrogliaux est primordiale, car les oligodendrocytes sont les cellules myélinisantes du système nerveux central. Ainsi, la diminution de la quantité de progéniteurs aboutit à des maladies neurodégénératives comme la sclérose en plaques. À l'inverse, une prolifération incontrôlée entraîne des tumeurs appelées oligodendrogliomes. Certaines tumeurs cérébrales sont vraisemblablement issues d'un défaut de différenciation des progéniteurs (rupture de la balance homéostatique) (Ligon, 2007). Les résultats expérimentaux du laboratoire démontrent pour la première fois que CK2 β est impliquée dans la prolifération des progéniteurs de la lignée oligodendrocytaire ainsi que dans leur différenciation. Elle pourrait donc être impliquée dans la transformation des précurseurs d'oligodendrocytes, et/ou dans leur dégénération.

L'utilisation du système cellulaire de mort induite et restauration de la viabilité a permis en première approche de définir les domaines de CK2 β fondamentaux pour sa fonction modulatrice. A long terme, la caractérisation de mutants permettant à la fois la restauration de la viabilité cellulaire et le développement de phénotypes remarquables conduira le laboratoire à procéder au « *knock-in* » de ces mutants chez la souris : le gène *CK2 β* portant la mutation d'intérêt sera introduit à la place du gène endogène dans des cellules ES. Ces cellules seront alors utilisées pour générer des souris afin d'évaluer l'impact de la mutation *in vivo*, dans un système intégré. En effet, le système actuel génère des cellules ES qui expriment le mutant de façon exogène, sous contrôle d'un promoteur viral, ce qui n'est donc pas représentatif du contexte cellulaire puisque la régulation est différente du gène endogène. En raison de l'implication de la protéine kinase CK2 dans diverses physiopathologies, notamment la carcinogenèse et la transformation cellulaire virale (Guerra & Issinger, 1999 ; Litchfield, 2003), ces modèles animaux seront pertinents pour définir avec précision les fonctions de la sous-unité régulatrice CK2 β .

.BIBLIOGRAPHIE.

- Aberg MA, Aberg ND, Palmer TD, Alborn AM, Carlsson-Skwirut C, Bang P, Rosengren LE, Olsson T, Gage FH, Eriksson PS, **2003**. *IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells*. *Mol Cell Neurosci*, 24: 23-40.
- Abramova N, Charniga C, Goderie SK, Temple S, **2005**. *Stage-specific changes in gene expression in acutely isolated mouse CNS progenitor cells*. *Dev Biol*, 283: 269-281.
- Aguirre A, Dupree JL, Mangin JM, Gallo V, **2007**. *A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination*. *Nat Neurosci*, online prepublication.
- Ahmed K, Gerber DA, Cochet C, **2002**. *Joining the cell survival squad : an emerging role for protein kinase CK2*. *Trends Cell Biol*, 12: 226-230.
- Ahn S & Joyner AL, **2005**. *In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog*. *Nature*, 437: 894-897.
- Ahrens T, Sleeman J, Schempp C, Howells N, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Simon J, **2001**. *Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid*. *Oncogene*, 20: 3399-3408.
- Akten B, Jauch E, Genova GK, Kim EY, Edery I, Raabe T, Jackson FR, **2003**. *A role for CK2 in the Drosophila circadian oscillator*. *Nat Neurosci*, 6: 251-257.
- Aladjem MI, Spike BT, Rodewald LW, Hope TJ, Klemm M, Jaenisch, Wahl GM, **1998**. *ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage*. *Current Biol*, 8: 145-155.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF, **2003**. *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci*, 100: 3983-3988.
- Allende JE & Allende CC, **1995**. *Protein kinases: protein kinase CK2, an enzyme with multiple substrates and puzzling regulation*. *FASEB J*, 9: 313-323.
- Allende CC & Allende JE, **1998**. *Promiscuous subunit interactions: a possible mechanism for the regulation of protein kinase CK2*. *J Cell Biochem, Suppl*, 30/31: 129-136.
- Altman J, **1962**. *Are new neurons formed in the brains of adult mammals ?* *Science*, 135: 1127-1129.
- Altman J, **1969**. *Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb*. *J Comp Neurol*, 137: 433-457.
- Altman J & Das GD, **1965**. *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. *J Comp Neurol*, 124 : 319-335.
- Alvarez-Buylla A & Lim DA, **2004**. *For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain*. *Neuron*, 41, 683-686.
- Ambrosetti DC, Basilico C, Dailey L, **1997**. *Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites*. *Mol Cell Biol*, 17: 6321-6329.
- Anderson DJ, **2001**. *Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual*. *Neuron*, 30: 19-35.
- Anderson MF, Aberg MA, Nilsson M, Eriksson PS, **2002**. *Insulin-like growth factor-I and neurogenesis in the adult mammalian brain*. *Brain Res Dev Brain Res*, 134: 115-122.
- Androutsellis-Theotokis, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW, Rueger MA, Bae SK, Kittapa R, McKay RDG, **2006**. *Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo*. *Nature*, 442: 823-826.
- Anneren C, Cowan CA, Melton DA, **2004**. *The Src family of tyrosine kinases is important for embryonic stem cell self renewal*. *J Biol Chem*, 279: 31590-31598.
- Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N, **2004**. *Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system*. *Neuron*, 41, 881-890.
- Armstrong RJ, Barker RA, **2001**. *Neurodegeneration: a failure of neuroregeneration?* *Lancet*, 358: 1174-1176.

- Arnett HA, Fancy SP, Alberta JA, Zhao C, Plant SR, Kaing S, Raine CS, Rowitch DH, Franklin RJ, Stiles CD, **2004**. *bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS*. *Science*, 306: 2111-2115.
- Aubert J, Dunstan H, Chambers I, Smith A, **2002**. *Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation*. *Nat Biotech*, 20: 1240-1245
- Avilion A, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R, **2003**. *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 function*. *Genes Dev*, 17: 126-140.
- Avots A, Harder F, Schmittwolf C, Petrovic S, Müller AM, **2002**. *Plasticity of hematopoietic stem cells and cellular memory*. *Immunol Rev*, 187: 9–21.
- Azari MF, Profyris C, Karnezis T, Bernard CC, Small DH, Cheema SS, Ozturk E, Hatzinisiriou I, Petratos S, **2006**. *Leukemia inhibitory factor arrests oligodendrocyte death and demyelination in spinal cord injury*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65: 914-929.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner J, Gottleib D, **1995**. *Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro*. *Dev Biol*, 168: 342-357.
- Bao ZZ & Cepko CL, **1997**. *The expression and function of Notch pathway genes in the developing rat eye*. *J Neurosci*, 17: 1425-1434.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN, **2006**. *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. *Nature*, 444: 756-760.
- Barres BA, Schmid R, Sendtner M, Raff MC, **1993**. *Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival*. *Development*, 118: 283-295.
- Bauer S & Patterson PH, **2006**. *Leukemia inhibitory factor promotes neural stem cell self-renewal in the adult brain*. *J Neurosci*, 26: 12089-12099.
- Beck KD, Powell-Braxton L, Widmer HR, Valverde J, Hefti F, **1995**. *Igfl gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons*. *Neuron*, 14: 717-730.
- Berardi A, Wang A, Levine J, Lopez P, Scadden D, **1995**. *Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells*. *Science*, 267: 104-108.
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F, **2002**. *Proneural genes and the specification of neural cell types*. *Nat Rev Neurosci*, 3: 517-530.
- Bettencourt-Dias M, Giet R, Sinka R, Mazumdar A, Lock WG, Balloux F, Zafiroopoulos PJ, Yamaguchi S, Winter S, Carthew RW, Cooper M, Jones D, Frenz L, Glover DM, **2004**. *Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression*. *Nature*, 432: 980-987.
- Bidwai AP, Reed JC, Glover CVC, **1995**. *Cloning and disruption of CKB1, the gene encoding the 38-kDa β subunit of *Saccharomyces cerevisiae* casein kinase II*. *J Biol Chem*, 270: 10395-10404.
- Bischoff R, **1994**. *The satellite cell and muscle regeneration*. *Myology*, Ed Engel & Franzini-Armstrong, 1: 97-118.
- Bjorling-Poulsen M, Siehler S, Wiesmüller L, Meek D, Niefind K, Issinger OG, **2005**. *The 'regulatory' b-subunit of protein kinase CK2 negatively influences p53-mediated allosteric effects on Chk2 activation*. *Oncogene*, 24 : 6194-6200.
- Blond O, Jensen HH, Buchou T, Cochet C, Issinger OG, Boldyreff B, **2005**. *Knocking out the regulatory subunit of protein kinase CK2 in mice: gene dosage effect in ES cells and embryos*. *Mol Cell Biochem*, 274: 31-37.
- Boldyreff B, Meggio F, Pinna LA, Issinger OG, **1993**. *Reconstitution of normal and hyperactivated forms of casein kinase 2 by variably mutated β -subunits*. *Biochem*, 32: 12675-12677.
- Boldyreff B, Meggio F, Pinna LA, Issinger OG, **1994**. *Efficient autophosphorylation and phosphorylation of the β -subunit by casein kinase 2 require the integrity of an acidic cluster 50 residues downstream from the phosphoacceptor site*. *J Biol Chem*, 269: 4827-4831.
- Bonab MM, Alimighaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B, **2006**. *Aging of mesenchymal stem cells in vitro*. *BMC Cell Biol*, 7:14.

- Bonnet D & Dick JE, **1997**. *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nature Medicine, 3 : 730-737.
- Brickman JM & Burdon TG, **2002**. *Pluripotency and tumorigenicity*. Nat Genet, 32: 557-558.
- Briscoe J, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell TM, Rubenstein JL, Ericson J, **1999**. *Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling*. Nature, 398: 622-627.
- Brustle O, Spiro AC, Karram K, Choudhary K, Okabe S, McKay RD, **1997**. *In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development*. Proc Natl Acad Sci, 94: 14809-14814.
- Brustle O, Choudhary K, Karram K, Huttner A, Murray K, Dubois-Dalcq M, McKay RD, **1998**. *Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats*. Nat Biotechnol, 16: 1040-1044.
- Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RDG, **1999**. *Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants*. Science, 285: 754-756.
- Buchou T & Cochet C, **2003a**. *La protéine kinase CK2 : une enzyme qui cultive la différence*. Médecine/Sciences, 19 : 709-716.
- Buchou T, Vernet M, Blond O, Jensen HH, Pointu H, Olsen BB, Cochet C, Issinger OG, Boldyreff B, **2003b**. *Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell autonomous defect and early embryonic lethality*. Mol Cell Biol, 23: 908-915.
- Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J, Smith A, **1999**. *Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells*. Developmental Biology, 210: 30-43.
- Burdon T, Smith A, Savatier P, **2002**. *Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells*. Trends Cell Biol, 12: 432-438.
- Cai J, Qi Y, Hu X, Tan M, Liu Z, Zhang J, Li Q, Sander M, Qiu M, **2005**. *Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling*. Neuron, 45: 41-53.
- Canton DA, Zhang C, Litchfield DW, **2001**. *Assembly of protein kinase CK2: investigation of complex formation between catalytic and regulatory subunits using a zinc-finger-deficient mutant of CK2 β* . Biochem J, 358: 87-94.
- Capecchi M, **1989**. *Altering the genome by homologous recombination*. Science, 309: 255-256.
- Capela A & Temple S, **2002**. *LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal*. Neuron, 35: 865-875.
- Carpenter MK, Cui X, Hu ZY, Jackson J, Sherman S, Seiger A, Wahlberg LU, **1999**. *In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells*. Exp Neurol, 158: 265-278.
- Carson MJ, Behringer RR, Brinster RL, McMorris FA, **1993**. *Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice*. Neuron, 10: 729-740.
- Casarosa S, Fode C, Guillemot F, **1999**. *Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon*. Development, 126: 525-534.
- Castella P, Wagner JA, Caudy M, **1999**. *Regulation of hippocampal neuronal differentiation by the basic helix-loop-helix transcription factors HES-1 and MASH-1*. J Neurosci Res, 56: 229-240.
- Cau E, Gradwohl G, Casarosa S, Kageyama R, Guillemot F, **2000**. *Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium*. Development, 127: 2323-2332.
- Cazillis M, Rasika S, Mani S, Gressens P, Lelièvre V, **2006**. *In vitro induction of neural differentiation of embryonic stem (ES) cells closely mimics molecular mechanisms of embryonic brain development*. Pediat Res, 59: 48-53.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A, **2003**. *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency-sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 113: 643-655.
- Chandran S, Kato H, Gerreli D, Compston A, Svendsen CN, Allen ND, **2003**. *FGF-dependent generation of oligodendrocytes by a hedgehog independent pathway*. Development 130, 6599-6609.

- Channavajhala PL & Seldin DC, **2002**. *Functional interaction of protein kinase CK2 and c-Myc in lymphogenesis*. *Oncogene*, 21: 5280-5288.
- Chantalat L, Leroy D, Filhol O, Nueda A, Benitez MJ, Chambaz EM, Cochet C, Dideberg O. **1999**. *Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization*. *EMBO J*, 18, 2930-2940
- Chen M, Li D, Krebs EG, Cooper JA, **1997**. *The casein kinase II β subunit binds to Mos and inhibits Mos activity*. *Mol Cell Biol*, 17: 1904-1912.
- Chen M & Cooper JA, **1997**. *The beta subunit of CKII negatively regulates Xenopus oocyte maturation*. *Proc Natl Acad Sci*, 94: 9136-9140.
- Chen JC & Goldhamer DJ, **2003**. *Skeletal muscle stem cells*. *Reprod Biol Endocrinol*, 1: 101.
- Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT, **2000**. *Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1*. *Science*, 287: 1804-1808.
- Cheng LC, Tavazoie M, Doetsch F, **2005**. *Stem cells: from epigenetics to microRNAs*. *Neuron*, 46: 363-367.
- Chenn A & Walsh CA, **2002**. *Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors*. *Science*, 297: 365-369.
- Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisen J, **2000**. *Generalized potential of adult neural stem cells*. *Science*, 288: 1660-1663.
- Clarke MF & Fuller M, **2006**. *Stem cells and cancer: two faces of eve*. *Cell*, 124: 1111-1115.
- Cochet C & Chambaz EM, **1983**. *Oligomeric structure and catalytic activity of G type casein kinase. Isolation of the two subunits and renaturation experiments*. *J Biol Chem*, 258: 1403-1406.
- Cohen P, **2002a**. *The origins of the protein phosphorylation*. *Nature Cell Biol*, 4: E127-E130.
- Cohen P, **2002b**. *Protein kinases: the major drug targets of the twenty-first century ?* *Nature Rev Drug Discov*, 1: 309-315.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D, **1996**. *In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain*. *J Neurosci*, 16: 2649-2658.
- Crosio C, Heitz E, Allis CD, Borrelli E, Sassone-Corsi P, **2003**. *Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signalling pathways induce specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons*. *J Cell Sci*, 116: 4905-4914.
- Czyz J & Wobus A, **2001**. *Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors*. *Differentiation*, 68: 167-174.
- Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G, **1997**. *Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro*. *J Cell Sci*, 110: 1279-1285.
- Davis AA & Temple S, **1994**. *A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex*. *Nature*, 372: 263-266.
- Dawson MR, Levine JM, Reynolds R, **2000**. *NG2-expressing cells in the central nervous system: Are they oligodendroglial progenitors?* *J Neurosci Res*, 61: 471-479.
- Dawson MR, Polito A, Levine JM, Reynolds R, **2003**. *NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS*. *Mol Cell Neurosci* 24: 476-488.
- De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A, **2007**. *Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy*. *Nat Biotech*, 25: 100-106.
- Dentremont KD, Ye P, D'Ercole AJ, O'Kusky JR, **1999**. *Increased insulin-like growth factor-I (IGF-I) expression during early postnatal development differentially increases neuron number and growth in medullary nuclei of the mouse*. *Brain Res Dev Brain Res*, 114: 135-141.
- D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutierrez-Ospina G, **1996**. *The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system*. *Mol Neurobiol*, 13: 227-255.

- Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, Magnenat E, Vilbois F, Hochmann A, Journot L, Antonsson B, Martinou JC, **2001**. *Phosphorylation of Bid by casein kinase I and II regulates its cleavage by caspase 8*. Mol Cell, 8: 601-611.
- Desai AR & McConnell SK, **2000**. *Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development*. Development, 127: 2863-2872.
- Dickinson ME, Krumlauf R, McMahon AP, **1994**. *Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system*. Development, 120: 1453-1471.
- Di Maira G, Brustolon F, Bertacchini J, Tosoni K, Marmiroli S, Pinna LA, Ruzzene M, **2007**. *Pharmacological inhibition of protein kinase CK2 reverts the multidrug resistance phenotype of a CEM cell line characterized by high CK2 level*. Oncogene, online prepublication.
- Dirks PB, **2006**. *Stem cells and brain tumours*. Nature, 444: 687-688.
- Doetsch F & Alvarez-Buylla A, **1996**. *Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain*. Proc Natl Acad Sci, 93: 14895-14900.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, **1997**. *Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain*. J Neurosci, 17: 5046-5061.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, **1999**. *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain*. Cell, 97: 703-716.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, **2002**. *EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells*. Neuron, 36: 1021-1034.
- Doetsch F, **2003a**. *A niche for adult neural stem cells*. Curr Op Genet Dev, 13: 543-550.
- Doetsch F, **2003b**. *The glial identity of neural stem cells*. Nature Neurosci, 6: 1127-1134.
- Doetschman T, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R, **1985**. *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium*. J Embry Exp Morph, 87: 27-45.
- Donella-Deana A, Cesaro L, Sarno S, Ruzzene M, Brunati AM, Marin O, Vilc G, Doherty-Kirby A, Lajoie G, Litchfield DW, Pinna LA, **2003**. *Tyrosine phosphorylation of protein kinase CK2 by Src-related tyrosine kinases correlates with increased catalytic activity*. Biochem J, 372: 841-849.
- Du ZW, Li XJ, Nguyen GD, Zhang SC, **2006**. *Induced expression of Olig2 is sufficient for oligodendrocyte specification but not for motoneuron specification and astrocyte repression*. Mol Cell Neurosci, 33 : 371-380.
- Engelmann MG & Franz WM, **2006**. *Stem cell therapy after myocardial infarction: ready for clinical application?* Curr Opin Mol Ther, 8: 396-414.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH, **1998**. *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat Med, 4: 1313-1317.
- Ernst M, Gearing DP, Dunn AR, **1994**. *Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transducing subunit gp130 in embryonic stem cells*. EMBO J, 13: 1574-1584.
- Evans M & Kaufman M, **1981**. *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 292: 154-156.
- Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, et al. **2000**. *In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain*. Proc Natl Acad Sci, 97: 14686-14691.
- Fialkow PJ, **1976**. *Clonal origin of human tumors*. Biochim Biophys Acta, 458: 283-321.
- Filhol O, Cochet C, **2002**. *Connexions protéine kinase CK2 et cancer: les preuves s'accumulent*. Bull Cancer, 89: 261-265.
- Filhol O, Nueda A, Martel V, Gerber-Scokaert D, Benitez MJ, Souchier C, Saoudi Y, Cochet C, **2003**. *Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits*. Mol Cell Biol, 23: 975-987.

- Filhol O, Benitez MJ, Cochet C, **2004a**. *A zinc ribbon motif is essential for the formation of functional tetrameric protein kinase CK2*. Zinc Finger Proteins: From Atomic Contact to Cellular Function, eds Iuchi & Kuldell, Landes Bioscience/Eurekah.com, chapter 18: 123-129.
- Filhol O, Martiel JL, Cochet C, **2004b**. *Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex*. EMBO Reports, 5: 351-355.
- Flax JD, Aurora S, Yang C, Simonon C, Wills AM, Billingham LL, Jendoubi M, Sidman RL, Wolfe JH, Kim SU, Snyder EY, **1998**. *Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes*. Nat Biotechnol, 16: 1033-1039.
- Frantz GD & McConnell SK, **1996**. *Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate*. Neuron, 17: 55-61.
- Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Maruxa Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J, **2000**. *Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference*. Nature, 408: 325-330.
- Fricke RA, Carpenter MK, Winkler C, Greco C, Gates MA, Bjorklund A, **1999**. *Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain*. J Neurosci, 19: 5990-6005.
- Fruttiger M, Karlsson L, Hall A, Bostrom H, Willetts K, Calver A, Bertold CH, Heath J, Betsholtz C, Richardson WD, **1999**. *Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice*. Development, 126: 457-467.
- Fuchs E & Segre JA, **2000**. *Stem cells: a new lease on life*. Cell, 100: 143-155.
- Gabay L, Lowell S, Rubin LL, Anderson DJ, **2003**. *Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro*. Neuron, 40 : 485-499.
- Gage FH, Ray J, Fisher LJ, **1995**. *Isolation, characterization and use of stem cells from the central nervous system*. Annu Rev Neurosci, 18: 159-192.
- Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J, **1998**. *Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus*. J Neurobiol, 36 : 249-266.
- Gage FH, **2000**. *Mammalian neural stem cells*. Science, 287: 1433-1438.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV, **2004**. *GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain*. Nature Neurosci, 7: 1233-1241.
- Gardner R & Beddington R, **1988**. *Multi-lineage „stem“ cells in the mammalian embryos*. J Cell Sci Suppl, 10: 11-27.
- Geiger H & Van Zant G, **2002**. *The aging of lymphohematopoietic stem cells*. Nat Immunol, 3: 329-333.
- Glover CVC, **1998**. *On the physiological role of casein kinase II in Saccharomyces cerevisiae*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 59: 95-133.
- Gottlieb DI, **2002**. *Large-scale sources of neural stem cells*. Annu Rev Neurosci, 25: 381-407.
- Götz M, Hartfuss E, Malatesta P, **2002**. *Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice*. Brain Res Bull, 57: 777-78.
- Götz M, **2003**. *Glial cells generate neurons--master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells*. Neuroscientist, 9: 379-397.
- Götz M & Barde YA, **2005**. *Radial-glial cells: defined and major intermediates between ES cells and CNS neurons*. Neuron, 46: 369-372.
- Götz M & Huttner WB, **2005**. *The cell biology of neurogenesis*. Nature Rev Mol Cell Biol, 6: 777-788.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ, **1999a**. *Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation*. Nat Neurosci, 2: 260-265.
- Gould E, Tanapat P, Hastings NB, Shors TJ. **1999b**. *Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning*. Trends Cogn Sci, 3: 186-192.
- Graham KC & Litchfield DW, **2000**. *The regulatory beta subunit of protein kinase CK2 mediates formation of tetrameric CK2 complexes*. J Biol Chem, 275: 5003-5010.

- Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L, **2003**. *SOX2 functions to maintain neural progenitor identity*. *Neuron*, 39: 49-65.
- Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL, **1996**. *Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renewal in response to bFGF factor*. *J Neurosci*, 16 : 1091-1100.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Gehron-Robey P, Shi S, **2000**. *Postnatal human dental pulp stem cells in vitro and in vivo*. *Proc Natl Acad Sci*, 97: 13625-13630.
- Guerra B, Siemer B, Boldyreff B, Issinger OG, **1999**. *Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2 β subunit fraction, devoid of the catalytic CK2 α subunit, in mouse brain and testicles*. *FEBS Letters*, 462 : 353-357.
- Guerra B & Issinger OG, **1999**. *Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology*. *Electrophoresis*, 20: 391-408.
- Guerra B, Issinger OG, Wang JYJ, **2003**. *Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory β -subunit of protein kinase CK2*. *Oncogene*, 22 : 4933-4942.
- Guo C, Yu S, Davis AT, Green JE, Ahmed K, **2001**. *A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells*. *J Biol Chem*, 276: 5992-5999.
- Hack MA, Sugimori M, Lundberg C, Nakafuku M, Gotz M, **2004**. *Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6*. *Mol Cell Neurosci*, 25: 664-678.
- Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo PM, Gotz M, **2005**. *Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis*. *Nat Neurosci*, 8: 865-872.
- Hall A, Giese NA, Richardson WD, **1996**. *Spinal cord oligodendrocytes develop from ventrally derived progenitor cells that express PDGF α -receptors*. *Development*, 122: 4085-4094.
- Halfpenny C, Benn T, Scolding N, **2002**. *Cell transplantation, myelin repair, and multiple sclerosis*. *Lancet Neurol*, 1: 31-40.
- Hanahan D & Weinberg RA, **2000**. *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 100: 57-70.
- Hanashima C, Li SC, Shen L, Lai E, Fishell G, **2004**. *Foxg1 suppresses early cortical cell fate*. *Science*, 303: 56-59.
- Hao J, Li TG, Qi X, Zhao DF, Zhao GQ, **2006**. *WNT/ β -catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells*. *Dev Biol*, 290: 81-91.
- Handyside A, **1978**. *Time of commitment of inside cells isolated from preimplantation mouse embryos*. *J Embryol Exp Zool*, 45 :37-53.
- Harris RG, Herzog EL, Bruscia EM, Grove JE, Van Arnem JS, Krause DS, **2004**. *Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia*. *Science*, 305: 90–93.
- Hasegawa A, Naruse M, Hitoshi S, Iwasaki Y, Takebayashi H, Ikenaka K, **2007**. *Regulation of glial development by cystatin C*. *J Neurochem*, 100: 12-22.
- Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Nakahara K, Carthew RW, Ruohola-Baker H, **2005**. *Stem cell division is regulated by the microRNA pathway*. *Nature*, 435: 974-978.
- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB, **2004**. *Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis*. *Proc Natl Acad Sci*, 101: 3196-3201.
- Helms AW, Battiste J, Henke RM, Nakada Y, Simplicio N, Guillemot F, Johnson JE, **2005**. *Sequential roles for Mash1 and Ngn2 in the generation of dorsal spinal cord interneurons*. *Development*, 132: 2709-2719.
- Heriche JK & Chambaz EM, **1998**. *Protein kinase CK2 α is a target for the Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases*. *Oncogene*, 17: 13-18.
- Hermanson O, Jepsen K, Rosenfeld MG, **2002**. *N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes*. *Nature*, 419: 934-939.
- Herrup K & Silver J, **1994**. *Cortical development and topographic maps: patterns of cellular dispersion in developing cerebral cortex*. *Curr Opin Neurobiol*, 4: 108-111.

- Hinrichs MV, Gatia M, Allende CC, Allende JE, **1995**. *Site-directed mutants of the β subunit of protein kinase CK2 demonstrate the important role of Pro-58*. FEBS, 368: 211-214.
- Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, Nakajima K, Akiyama T, Masuyama N, Gotoh Y, **2004**. *The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells*. Development, 131: 2791-2801.
- Hirano T, Ishihara K, Hibi M, **2000**. *Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors*. Oncogene, 19: 2548-2556.
- Hsieh J & Gage FH, **2004**. *Epigenetic control of neural stem cell fate*. Curr Op Genet Dev, 14: 461-469.
- Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH, **2004**. *Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci, 101: 16659-16664.
- Hunter T & Karin M, **1992**. *The regulation of transcription by phosphorylation*. Cell, 70: 375-387.
- Ikeya M, Lee SM, Johnson JE, McMahon AP, Takada S, **1997**. *Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors*. Nature, 389: 966-970.
- Ishikawa F, Shimazu H, Shultz LD, Fukata M, Nakamura R, Lyons B, Shimoda K, Shimoda S, Kanemaru T, Nakamura K, Ito H, Kaji Y, Perry ACF, Harada M, **2006**. *Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion*. FASEB J, 20: 950-952.
- Jackson EL, Garcia-Verdugo JM, Gil-Perotin S, Roy M, Quinones-Hinojosa A, Vandenberg S, Alvarez-Buylla A, **2006**. *PDGFR α -positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling*. Neuron. 51: 187-199.
- Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ, **2004**. *Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion*. Nat Cell Biol, 6: 532-539.
- Jauch E, Melzig J, Brkulj M, Raabe T, **2002**. *In vivo functional analysis of Drosophila protein kinase casein kinase 2 (CK2) beta-subunit*. Gene, 298: 29-39.
- Jenuwein T & Allis CD, **2001**. *Translating the histone code*. Science, 293: 1074-1080.
- Jessell TM & Sanes JR, **2000**. *The decade of the developing brain*. Curr Opin Neurobiol, 10: 599-611.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg a, Lowk WC, Largaespada DA, Verfaillie CM, **2002a**. *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature, 418: 41-49.
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM, **2002b**. *Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain*. Exp Hematolo, 30: 896-904.
- Johnson MH & Ziomeck CA, **1981**. *The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula*. Cell, 24: 71-80.
- Jones P, Harper S, Watt F, **1995**. *Stem-cell patterning and fate in human epidermis*. Cell, 80: 83-93.
- Kageyama R & Ohtsuka T, **1999**. *The Notch-Hes pathway in mammalian neural development*. Cell Res, 9: 179-188.
- Kato T, Heike T, Okawa K, Haruyama M, Shiraishi K, Yoshimoto M, Nagato M, Shibata M, Kumada T, Yamanaka Y, Hattori H, Nakahata T, **2006**. *A neurosphere-derived factor, cystatin C, supports differentiation of ES cells into neural stem cells*. Proc Natl Acad Sci, 103: 6019-6024.
- Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles M, **1993**. *Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture*. Mol Cell Biol, 13: 473-486.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH, **1997**. *More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment*. Nature, 386: 493-495.
- Kempermann G, Brandon EP, Gage FH, **1998**. *Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus*. Curr Biol, 8: 939-942.
- Kempermann G & Gage FH, **1999**. *Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal*. Hippocampus, 9: 321-332.

- Kerbel RS, Lagarde AE, Dennis JW, Donaghue TP, **1983**. *Spontaneous fusion in vivo between normal host and tumour cells: possible contribution to tumour progression and metastasis studied with a lectin-resistant mutant tumour*. Mol Cell Biol, 3: 523-538.
- Kesari S & Stiles CD, **2006**. *The bad seed: PDGF receptors link adult neural progenitors to glioma stem cells*. Neuron, 51: 151-152.
- Kessarlis N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD, **2006**. *Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage*. Nat Neurosci, 9: 173-179.
- Kielman MF, Rindapää M, Gaspar C, Van Poppel N, Breukel C, Van Leeuwen S, Taketo MM, Roberts S, Smits R, Fodde R, **2002**. *Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of β -catenin signaling*. Nat Genet, 32: 594-605.
- Kilpatrick TJ & Bartlett PF, **1993**. *Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation*. Neuron, 10: 255-265.
- Kilpatrick TJ & Bartlett PF, **1995**. *Cloned multipotential precursors for the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF*. J Neurosci, 15: 3653-3661.
- Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R, **2006**. *Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres*. Nature, 444: 481-485.
- Kim JS, Eom JI, Cheong JW, Choi AJ, Lee JK, Yang WI, Min YH, **2007**. *Protein kinase CK2 α as an unfavorable prognostic marker and novel therapeutic target in acute myeloid leukaemia*. Clin Cancer Res, 13: 1019-1028.
- Kippin TE, Martens DJ, van der Kooy D, **2005**. *P21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity*. Genes Dev, 19: 756-767.
- Kobayashi M, Nishikawa K, Suzuki T, Yamamoto M, **2001**. *The homeobox protein Six3 interacts with the Groucho corepressor and acts as a transcriptional repressor in eye and forebrain formation*. Dev Biol, 232: 315-326.
- Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P, **2004**. *A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential*. J Exp Med, 200: 123-135.
- Kondo T & Raff M, **2000**. *Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells*. Science, 289: 1754-1757.
- Kondo T & Raff M, **2004**. *Chromatin remodeling and histone modification in the conversion of oligodendrocyte precursors to neural stem cells*. Genes Dev, 18: 2963-2972.
- Korolchuk VI, Cozier G, Banting G, **2005**. *Regulation of CK2 activity by phosphatidyl inositol phosphates*. J Biol Chem, 280, 40796-40801.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ, **2001**. *Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow derived stem cell*. Cell, 105: 369-377.
- Krek W, Maridor G, Nigg EA, **1992**. *Casein kinase II is a predominantly nuclear enzyme*. J Cell Biol, 116: 43-55.
- Kriegstein AR & Götz M, **2003**. *Radial glia diversity: a matter of cell fate*. Glia, 43: 37-43.
- Kufe D, Nadler L, Sargent L, Shapiro H, Hand P, Austion F, Colcher D, Schlom J, **1983**. *Biological behavior of human breast carcinoma-associated antigens expressed during cellular proliferation*. Cancer Res, 43: 851-857.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH, **1997**. *Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain*. J Neurosci, 17 : 5820-5829.
- Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusabe M, Steindler DA, **1999**. *Multipotent stem/cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain*. Exp Neurol, 156: 333-344.

- Kusk M, Ahmed R, Thomsen B, Bendixen C, Issinger OG, Boldyreff B, **1999**. *Interaction of protein kinase CK2beta subunit within the holoenzyme and with other proteins*. Mol Cell Biochem, 191: 51-58.
- Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV, **2003**. *Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo*. Nat Neurosci, 6: 21-27.
- Landesman-Bollag E, Channavajhala PL, Cardiff RD, Seldin DC, **1998**. *P53 deficiency and misexpression of protein kinase CK2 α collaborate in the development of thymic lymphomas in mice*. Oncogene, 16: 2965-2974.
- Landesman-Bollag E, Romieu-Mourez R, Song DH, Sonenshein GE, Cardiff RD, Seldin DC, **2001a**. *Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis*. Oncogene, 20: 3247-3257.
- Landesman-Bollag E, Song DH, Romieu-Mourez R, Sussman DJ, Cardiff RD, Sonenshein GE, Seldin DC, **2001b**. *Protein kinase CK2 : signalling and tumorigenesis in the mammary gland*. Mol Cell Biochem, 227: 153-165.
- Lang KJ, Rathjen J, Vassilieva S, Rathjen PD, **2004**. *Differentiation of embryonic stem cells to a neural fate : a route to re-building the nervous system?* J Neurosci Res, 76: 184-192.
- Langa F, Kress C, Colucci-Guyon E, Khun H, Vandormae-Pournin S, Huerre M, Babinet C, **2000**. *Teratocarcinomas induced by embryonic stem (ES) cells lacking vimentin: an approach to study the role of vimentin in tumorigenesis*. J Cell Science, 113 : 3463-3472.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE, **1994**. *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. Nature, 367: 645-648.
- Laramas M, Pasquier D, Filhol O, Ringeisen F, Descotes JL, Cochet C, **2007**. *Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2 α) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer 5*. Eur J Cancer, 43: 928-934.
- Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V, Dominis M, Kemler R, **1996**. *A role for cadherins in tissue formation*. Development, 122: 3185-3194.
- Laudet B, Barette C, Dulery V, Renaudet O, Dumy P, Metz A, Prudent R, Deshiere A, Dideberg O, Filhol O, Cochet C, **2007**. *Structure-based design of small peptide inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction*. Biochem J, online prepublication.
- Lawler J, Miao WM, Duquette M, Bouck N, Bronson RT, Hynes RO, **2001**. *Thrombospondin-1 Gene Expression Affects Survival and Tumor Spectrum of p53-Deficient Mice*. Am J Path, 159: 1949-1956.
- Lawson K, Larentowicz L, Artim S, Hayes CS, Gilmour SK, **2006**. *A novel protein kinase CK2 substrates indicates CK2 not directly stimulated by polyamines in vivo*. Biochem, 45: 1499-1510.
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA, **2000**. *Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain*. Proc Natl Acad Sci, 97: 13883-13888.
- Leahy A, Xiong JW, Kuhnert F, Stuhlmann H, **1999**. *Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation*. J Exp Zool, 284: 67-81.
- Lee SM, Tole S, Grove E, McMahon AP, **2000**. *A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus*. Development, 127: 457-467.
- Lee JH, Hart SR, Skalnik DG, **2004**. *Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation*. Genesis, 38: 32-38.
- Lee JP, Jeyakumar M, Gonzalez R, Takahashi H, Lee PJ, Baek RC, Clark D, Rose H, Fu G, Clarke J, McKercher S, Meerloo J, Muller FJ, Park KI, Butters TD, Dwek RA, Schwartz P, Tong G, Wenger D, Lipton SA, Seyfried TN, Platt FM, Snyder EY, **2007**. *Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease*. Nat Medicine, 13: 439-447.
- Lehner B, Semple JI, Brown SE, Counsell D, Campbell RD, Sanderson CM, **2004**. *Analysis of a high-throughput yeast two-hybrid system and its use to predict the function of intracellular proteins encoded within the human MHC class III region*. Genomics, 83: 153-167.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD, **1990**. *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. Cell, 60: 585-595.

- Leroy D, Heriche JK, Filhol O, Chambaz EM, Cochet C, **1997**. *Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme. A proposed role for the kinase stimulation.* J Biol Chem, 272: 20820-20827.
- Levison SW & Goldman JE, **1993**. *Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain.* Neuron, 10: 201-212.
- Levison SW, Young GM, Goldman JE, **1999**. *Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially generate oligodendroglia.* J Neurosci Res, 57: 435-446.
- Li, E, **2002**. *Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development.* Nat Rev Genet, 3: 662-673.
- Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH, **2004**. *Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 44: 399-421.
- Ligon KL, Alberta JA, Kho AT, Weiss J, Kwaan MR, Nutt CL, Louis DN, Stiles CD, Rowitch DH, **2004**. *The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas.* J Neuropathol Exp Neurol, 63: 499-509.
- Ligon KL, Kesari S, Kitada M, Sun T, Arnett HA, Alberta JA, Anderson DJ, Stiles CD, Rowitch DH, **2006**. *Development of NG2 neural progenitor cells requires Olig gene function.* Proc Natl Acad Sci, 103: 7853-7858.
- Ligon KL, Huillard E, Mehta S, Kesari S, Liu H, Alberta JA, Bachoo RM, Kane M, Louis DN, DePinho RA, Anderson DJ, Stiles CD, Rowitch DH, **2007**. *Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma.* Neuron, 53: 503-517.
- Lin WJ, Sheu GT, Traugh JA, **1994**. *Effects of autophosphorylation on casein kinase II activity: evidence from mutations in the beta subunit.* Biochemistry, 33: 6998-7004.
- Lindsell CE, Shawber CJ, Boulter J, Weinmaster G, **1995**. *Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1.* Cell, 80: 909-917.
- Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A, **2004**. *Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work.* Nat Med, 10(Suppl.): 42-50.
- Litchfield DW, Lozeman FJ, Cicirelli MF, Harrylock M, Ericsson LH, Piening CJ, Krebs EG, **1991**. *Phosphorylation of the beta subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34^{cdc2}.* J Biol Chem, 266: 20380-20389.
- Litchfield DW, Lusher B, Lozeman FJ, Eisenman RN, Krebs EG, **1992**. *Phosphorylation of casein kinase II by p34^{cdc2} in vitro and at mitosis.* J Biol Chem, 267: 13943-13951.
- Litchfield LW, **2003**. *Protein kinase CK2 : structure, regulation and role in cellular decisions of life and death.* Biochem J, 369: 1-15.
- Loebel D, Watson C, De Young RA, Tam PP, **2003**. *Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells.* Dev Biol, 264: 1-14.
- Lois C & Alvarez-Buylla A, **1993**. *Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia.* Proc Natl Acad Sci, 90: 2074-2077.
- Lois C & Alvarez-Buylla A, **1994**. *Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain.* Science, 264: 1145-1148.
- Lorenz P, Pepperkok R, Ansorge W, Pyerin W, **1993**. *Cell biological studies with monoclonal and polyclonal antibodies against Human Casein Kinase II subunit β demonstrate participation of the Kinase in Mitogenic Signaling.* J Biol Chem, 268: 2733-2739.
- Lorenz P, Pepperkok R, Pyerin W, **1994**. *Requirement of casein kinase 2 for entry into and progression through early phases of the cell cycle.* Cell Mol Biol Res, 40: 519-527.
- Lotem J & Sachs L, **2006**. *Epigenetics and the plasticity of differentiation in normal and cancer stem cells.* Oncogene, 25: 7663-7672.
- Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon AP, Stiles CD, Rowitch DH, **2000**. *Sonic hedgehog regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system.* Neuron, 25: 317-329.

- Lu QR, Cai L, Rowitch DH, Cepko CL, Stiles CD, **2001**. *Ectopic expression of Olig1 promotes oligodendrocyte formation and reduces neuronal survival in developing mouse cortex*. Nat Neurosci, 4: 973-974.
- Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD, Rowitch DH, **2002**. *Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection*. Cell, 109: 75-86.
- Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R, **2001**. *Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets*. Science, 292: 1389-1394.
- Lüscher B & Litchfield DW, **1994**. *Biosynthesis of casein kinase II in lymphoid cell lines*. Eur J Biochem, 220, 521-526.
- MacLean M & Picard D, **2003**. *Cdc37 goes beyond Hsp90 and kinases*. Cell Stress Chaperones, 8: 114-119.
- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus A, **1993**. *Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types*. Mech Dev, 44: 41-50.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S, **2002**. *The protein kinase complement of the human genome*. Science, 298: 1912-1934.
- Marin O, Meggio F, Sarno S, Pinna LA, **1997**. *Physical dissection of the structural elements responsible for regulatory properties and intersubunit interactions of protein kinase CK2 beta-subunit*. Biochem, 36: 7192-7198.
- Marin-Husstege M, Muggironi M, Liu A, Casaccia-Bonnel P, **2002**. *Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression*. J Neurosci, 22: 10333-10345.
- Marks JL, King MG, Baskin DG, **1991a**. *Localization of insulin and type I IGF receptors in rat brain by in vitro autoradiography and in situ hybridization*. Adv Exp Med Biol, 293: 459-470.
- Marks JL, Porte D Jr, Baskin DG, **1991b**. *Localization of type I insulin-like growth factor receptor messenger RNA in the adult rat brain by in situ hybridization*. Mol Endocrinol, 5: 1158-1168.
- Marshall CGA, Novitsch BG, Goldman JE, **2005**. *Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells*. J Neurosci, 25: 7289-7298.
- Martel V, Filhol O, Nueda A, Gerber D, Benitez MJ, Cochet C, **2001**. *Visualization and molecular analysis of nuclear import of protein kinase CK2 subunits in living cells*. Mol Cell Biochem, 227: 81-90.
- Martel V, Filhol O, Nueda A, Cochet C, **2002**. *Dynamic localization/association of protein kinase CK2 subunits in living cells: a role in its cellular regulation?* Ann N Y Acad Sci, 973: 272-277.
- Martin G, **1981**. *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc Natl Acad Sci, 78: 7634-7638.
- Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A, **2005**. *Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid*. Nature Med, 11: 228-232.
- Martinez-Serrano A, Rubio FJ, Navarro B, Bueno C, Villa A, **2001**. *Human neural stem and progenitor cells: in vitro and in vivo properties, and potential for gene therapy and cell replacement in the CNS*. Curr Gene Ther, 1: 279-299.
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MSH, Niwa H, **2007**. *Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells*. Nat Cell Biol, 9: 625-635.
- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T, **1999**. *STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells*. EMBO J, 18: 4261-4269
- Mauro A, **1961**. *Satellite cells of skeletal muscle fibers*. J Biophys Biochem Cytol 9: 493-495.
- Maye P, Becker S, Siemen H, Thorne J, Byrd N, Carpentino J, Grabel L, **2004**. *Hedgehog signalling is required for the differentiation of ES cells into neurectoderm*. Dev Biol, 265: 276-290.
- McConnell SK & Kaznowski CE, **1991**. *Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex*. Science, 254: 282-285.

- McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb D, Choi DW, **1999**. *Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord*. *Nature Med*, 5: 1410-1412.
- McKay R, **1997**. *Stem cells in the central nervous system*. *Science*, 276: 66-71.
- Meggio F, Boldyreff B, Issinger OG, Pinna LA, **1993**. *The autophosphorylation and p34cdc2 phosphorylation sites of casein kinase-2 beta-subunit are not essential for reconstituting the fully-active heterotetrameric holoenzyme*. *Biochim Biophys Acta*, 1164: 223-225.
- Meggio F, Negro A, Sarno S, Ruzzene M, Bertoli A, Sorgato MC, Pinna LA, **2000**. *Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2*. *Biochem J*, 352: 191-196.
- Meggio F & Pinna LA. **2003**. *One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2 ?* *FASEB J*. 17, 349-368
- Meletis K, Wirta V, Hede SM, Nister M, Lundeberg J, Frisen J, **2006**. *P53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells*. *Development*, 133: 363-369.
- Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, Bakker K, Both S, Platenburg PP, Oner FC, De Bruijn JD, Van Blitterswijk CA, **2002**. *Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age*. *Tissue Eng*, 8: 911-920.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A, **2006**. *Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain*. *J Neurosci*, 26: 7907-7918.
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, **2004**. *Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone*. *Proc Natl Acad Sci*, 101: 17528-17532.
- Merkle FT & Alvarez-Buylla A, **2006**. *Neural stem cells in mammalian development*. *Curr Opin Cell Biol*, 18: 704-709.
- Messenger MM, Saulnier RB, Gilchrist AD, Diamond P, Gorbsky GJ, Litchfield DW, **2002**. *Interactions between protein kinase CK2 and Pin1. Evidence for phosphorylation-dependant interactions*. *J Biol Chem*, 277: 23054-23064.
- Meyn MA 3rd, Schreiner SJ, Dumitrescu TP, Nau GJ, Smithgall TE, **2005**. *Src family kinase activity is required for murine embryonic stem cell growth and differentiation*. *Mol Pharmacol*, 68: 1320-1330.
- Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B, **2003**. *Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains*. *Proc Natl Acad Sci*, 100: 1304-1369
- Miller-Hance W, LaCorbiere M, Fuller S, Evans S, Lyons G, Schmidt C, Robbins J, Chien K, **1993**. *In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis*. *J Biol Chem*, 268: 25244-25252.
- Mintz B & Baker WW, **1967**. *Normal mammalian muscle differentiation and gene control of isocitrate dehydrogenase synthesis*. *Proc Natl Acad Sci*, 58: 592-598.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S, **2003**. *The homeoprotein Nanog is required for maintenance of the pluripotency in mouse epiblast and ES cells*. *Cell*, 113: 631-642.
- Miyata Y & Nishida E, **2004**. *CK2 controls multiple protein kinases by phosphorylating a kinase-targeting molecular chaperone, Cdc37*. *Mol Cell Biol*, 24: 4065-4074.
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K, **2002**. *Two major SMAD pathways in TGF-beta superfamily signalling*. *Genes Cells* 7, 1191-1204.
- Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K, Nakafuku M, **2001**. *Combinatorial roles of olig2 and neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons*. *Neuron*, 31: 757-771.
- Mizuseki K, Sakamoto T, Watanabe K, Muguruma K, Ikeya M, Nishiyama A, Arakawa A, Suemori H, Nakatsuji N, Kawasaki H, Murakami F, Sasai Y, **2003**. *Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci*, 100: 5825-5833.
- Monge M, Kadiiski D, Jacque C, Zalc B, **1986**. *Oligodendroglial expression and deposition of four major myelin constituents in the myelin sheath during development. An in vivo study*. *Dev Neurosci*, 8: 222-235.

- Montarolo PG, Goelet P, Castellucci VF, Morgan J, Kandel ER, Schacher S, **1986**. *A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in Aplysia*. Science, 234: 1249-1254.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, Van Der Kooy D, **1994**. *Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells*. Neuron, 13:1071-1082.
- Muhr J, Andersson E, Persson M, Jessell TM, Ericson J, **2001**. *Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube*. Cell, 104: 861-873.
- Muller FJ, Snyder EY, Loring JF, **2006**. *Gene therapy: can neural stem cells deliver ?* Nat Rev Neurosci, 7: 75-84.
- Muñoz-Sanjuán I & Brivanlou AH, **2002**. *Neural induction, the default model and embryonic stem cells*. Nat Rev Neurosci, 3: 271-280.
- Muroyama Y, Kondoh H, Takada S, **2004**. *Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture*. Biochem Biophys Res Commun, 313: 915-921.
- Nakano I, Paucar AA, Bajpai R, Dougherty JD, Zewail A, Kelly TK, Kim KJ, Ou J, Groszer M, Imura T, Freije WA, Nelson SF, Sofroniew MV, Wu H, Liu X, Terskikh AV, Geschwind DH, Kornblum HI, **2005**. *Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) regulates multipotent neural progenitor proliferation*. J Cell Biol, 170: 413-427.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, et al. **2002**. *Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors*. Cell, 110: 429-441.
- Naruse M, Nakahira E, Miyata T, Hitoshi S, Ikenaka K, Bansal R, **2006**. *Induction of oligodendrocyte progenitors in dorsal forebrain by intraventricular microinjection of FGF-2*. Dev Biol, 297: 262-273.
- Nery S, Wichterle H, Fishell G, **2001**. *Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain*. Development 128, 527-540.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A, **1998**. *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. Cell, 95: 379-391.
- Niefind K, Guerra B, Ermakowa J, Issinger OG. **2001**. *Crystal structure of human protein kinase CK2 : insights into basic properties of the CK2 holoenzyme*. EMBO J. 20, 53520-5331
- Niefind K & Issinger OG, **2006**. *Primary and secondary interactions between CK2 α and CK2 β lead to ring-like structures in the crystals of the CK2 holoenzyme*. Mol Cell Biochem, 274: 3-14.
- Nishimura F, Yoshikawa M, Kanda S, Nonaka M, Yokota H, Shiroy A, Nakase H, Hirabayashi H, O uji Y, Birumachi J, Ishizaka S, Sakaki T, **2003**. *Potential use of embryonic stem cells for the treatment of mouse parkinsonian models : improved behaviour by transplantation of in vitro differentiated dopaminergic neurons from embryonic stem cells*. Stem Cells, 21: 171-180.
- Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB, **1996**. *Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain*. J Neurosci Res, 43: 299-314.
- Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A, **1998**. *Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3*. Genes Dev, 125: 2048-2060.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith A, **2000**. *Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells*. Nature Genet, 24: 372-376.
- Niwa H, **2001**. *Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells*. Cell Struct Funct, 26: 137-148.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR, **2004**. *Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases*. Nature Neurosci, 7: 136-144.
- Nozaki T, Masutani M, Watanabe M, Ochiya T, Hasegawa F, Nakagama H, Suzuki H, Sugimura T, **1999**. *Syncytiotrophoblastic giant cells in teratocarcinomalike tumors derived from Parp-disrupted mouse embryonic stem cells*. PNAS. 96 (23), 13345-13350

- Nuthall HN, Joachim K, Stifani S, **2004**. *Phosphorylation of Serine 239 of Groucho/TLE1 by protein kinase CK2 is important for inhibition of neuronal differentiation*. Mol Cell Biol, 24: 8395-8407.
- Nye JS, Kopan R, Axel R, **1994**. *An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells*. Development, 120: 2421-2430.
- Okada Y, Shimazakia T, Sobue G, Okano H, **2004**. *Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells*. Dev Biol, 275: 124-142.
- O'Kusky JR, Ye P, D'Ercole AJ, **2000**. *Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development*. J Neurosci, 20: 8435-8442.
- Olsten MEK & Litchfield DW, **2004**. *Order or chaos ? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2*. Biochem Cell Biol, 82: 681-693.
- Olsten ME, Weber JE, Litchfield DW, **2005**. *CK2 interacting proteins: emerging paradigms for CK2 regulation?* Mol Cell Biochem, 274: 115-124.
- Otero JJ, Fu W, Kan L, Cuadra AE, Kessler JA, **2004**. *β -Catenin signaling is required for neural differentiation of embryonic stem cells*. Development, 131: 3545-3557.
- Pacacios R, Golunski E, Samaridis J, **1995**. *In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cells line*. Proc Natl Acad Sci, 92: 7530-7534.
- Padmanabha R, Chen-Wu JL, Hanna DE, Glover CVC. **1990**. *Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene : casein kinase II is essential for viability in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. 10, 4089-4099
- Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, Cova L, Grioni E, Onofri M, Cavallaro M, Etteri S, Vitello F, Giombini S, Solero CL, Parati EA, **2000**. *Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb*. Stem Cells, 18: 295-300.
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A, **2005**. *Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain*. Development, 132: 335-344.
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH, **1997**. *The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells*. Mol Cell Neurosci, 8: 389-404.
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH, **1999**. *Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS*. J Neurosci, 19: 8487-8497.
- Panchision DM & McKay RDH, **2002**. *The control of neural stem cells by morphogenic signals*. Curr Opin Genet Dev, 12: 478-487.
- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ, **2003**. *Applying the principles of stem-cell biology to cancer*. Nature Review Cancer, 3: 895-902.
- Parent JM, **2003**. *Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain*. Neuroscientist, 9: 261-272.
- Park KI, Teng YD, Snyder EY, **2002**. *The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue*. Nat Biotechnol, 20: 1111-1117.
- Parras CM, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, Johnson JE, Nakafuku M, Vescovi A, Guillemot F, **2004**. *Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain*. EMBO J, 23: 4495-4505.
- Parras CM, Hunt C, Sugimori M, Nakafuku M, Rowitch D, Guillemot F, **2007**. *The proneural gene Mash1 specifies an early population of telencephalic oligodendrocytes*. J Neurosci, 27: 4233-4242.
- Parson A, **2006**. *The long journey from stem cells to medical product*. Cell, 125: 9-11.
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L. and Baltimore D, **1993**. *Production of high-titer helper free retroviruses by transient transfection*. Proc Natl Acad Sci, 90: 8392-8396.
- Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F, De Luca M, **2001**. *P63 identifies keratinocyte stem cells*. Proc Natl Acad Sci, 98: 3156-3161.

- Pepperkok R, Lorenz P, Ansorge W, Pyerin W, **1994**. *Casein kinase II is required for transition of G₀/G₁, early G₁, and G₁/S phases of the cell cycle*. J Biol Chem, 269: 6986-6991.
- Pera EM, Ikeda A, Eivers E, De Robertis EM, **2003**. *Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction*. Genes Dev, 17: 3023– 3028.
- Pesce M & Scholer HR, **2001**. *Oct4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development*. Stem Cells, 19: 271-278.
- Pinna LA, **2002**. *Protein kinase CK2: a challenge to canons*. J Cell Sci, 115: 3873-3878.
- Pompe S, Bader M, Tannert C, **2005**. *Stem-cell research: the state of the art*. EMBO Reports, 6: 297-300.
- Potten C & Hendry J, **1983**. *Stem cells in murine small intestine*. Stem Cells: their Identification and Characterisation, Ed Potten C, 155-199.
- Pringle NP & Richardson WD, **1993**. *A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage*. Development, 117: 525-533.
- Pringle NP, Yu WP, Guthrie S, Roelink H, Lumsden A, Peterson AC, Richardson WD, **1996**. *Determination of neuroepithelial cell fate: induction of the oligodendrocyte lineage by ventral midline cells and Sonic hedgehog*. Dev Biol, 177: 30-42.
- Pringle NP, Guthrie S, Lumsden A, Richardson WD, **1998**. *Dorsal spinal cord neuroepithelium generates astrocytes but not oligodendrocytes*. Neuron, 20: 883-893.
- Puelles L & Rubenstein JLR, **1993**. *Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization*. Trends Neurosci, 16: 472-479.
- Qi X, Li TG, Hao J, Hu J, Wang J, Simmons H, Miura S, Mishina Y, Zhao GQ, **2004**. *BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways*. Proc Natl Acad Sci, 101: 6027-6032.
- Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S, **2000**. *Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells*. Neuron, 28: 69-80.
- Rando TA, **2006**. *Stem cells, ageing and the quest for immortality*. Nature, 44: 1080-1086.
- Rao MS, **1999**. *Multipotent and restricted precursors in the central nervous system*. Anat Rec, 257: 137-148.
- Raz R, Lee CK, Cannizzaro LA, D'Eustachio P, Levy DE, **1999**. *Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency*. Proc Natl Acad Sci, 96: 2846-2851.
- Reed JC, Bidwai AP, Glover CVC. **1995**. *Cloning and disruption of CKB2, the gene encoding the 32-kDa β' subunit of Saccharomyces cerevisiae casein kinase II*. J Biol Chem. 269, 18192-18200
- Reik W, Dean W, Walter J, **2001**. *Epigenetic reprogramming in mammalian development*. Science, 293 : 1089-1993.
- Reya T, Monnison SJ, Clarke MF, Weissman IL, **2001**. *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 414: 105-111.
- Reya T & Clevers H, **2005**. *Wnt signalling in stem cells and cancer*. Nature, 434 : 843-850.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM, **2001**. *Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells*. Blood, 98: 2615-2625.
- Reynolds BA & Weiss S, **1992**. *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. Science, 255: 1707-1710.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S, **1992**. *A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes*. J Neurosci, 12: 4565-4574.
- Reynolds BA & Weiss S, **1996**. *Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell*. Dev Biol, 175: 1-12.
- Rice CM, Halfpenny CA, Scolding NJ, **2003**. *Stem cells for the treatment of neurological disease*. Transfus Med, 13: 351-361.

- Rice CM & Scolding NJ, **2004**. *Adult stem cells – reprogramming neurological repair?* The Lancet, 364: 193-199.
- Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF, **1992**. *De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain*. Proc Natl Acad Sci, 89: 8591-8595.
- Rich JN & Bigner DD, **2004**. *Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma*. Nat Rev Drug Discov, 3: 430-446.
- Robertson EJ, **1987**. *Teratocarcinomas and embryonic stem cells, a practical approach*. Practical Approach Series. IRL Press: 71-112.
- Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold H, Hescheler J, Wobus A, **1994**. *Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents*. Dev Biol, 164: 87-101.
- Romieu-Mourez R, Landesman-Bollag E, Seldin DC, Traish AM, Sonenshein GE, **2001**. *Roles of IKK kinases and protein kinase CK2 in activation of nuclear factor- κ B in breast cancer*. Cancer Res, 61: 3810-3818.
- Romieu-Mourez R, Landesman-Bollag E, Seldin DC, Sonenshein GE. **2002**. *Protein kinase CK2 promotes aberrant activation of nuclear factor- κ B, transformed phenotype, and survival of breast cancer cells*. Cancer Res, 62: 6770-6778.
- Roussou I & Draetta G, **1994**. *The Schizosaccharomyces pombe casein kinase II alpha and beta subunits: evolutionary conservation and positive role of the beta subunit*. Mol Cell Biol, 14: 576-586.
- Rose-John S, **2002**. *GP130 stimulation and the maintenance of stem cells*. Trends Biotech, 20: 417-419.
- Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD, **2003**. *Basic helix-loop-helix factors in cortical development*. Neuron, 39: 13-25.
- Rowitch DH, **2004**. *Glial specification in the vertebrate neural tube*. Nat Rev Neurosci, 5: 409-419.
- Ryu SW, Woo JH, Kim YH, Lee YS, Park JW, Bae YS, **2006**. *Downregulation of protein kinase CKII is associated with cellular senescence*. FEBS Letters, 580 : 988–994
- Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH, **2004**. *Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation on Wnt signalling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor*. Nature Med, 10: 55-63.
- Savatier P, Huang S, Szekely L, Wiman KG, Samarut J, **1994**. *Contrasting pattern of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts*. Oncogene, 9: 809-818.
- Schmitt R, Bruyns E, Snodgrass H, **1991**. *Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression*. Genes Dev, 5: 728-740.
- Schmittwolf C, Kirchhof N, Jauch A, Durr M, Harder F, Zenke M, Müller AM, **2005**. *In vivo haematopoietic activity is induced in neurosphere cells by chromatin-modifying agents*. EMBO Journal, 24 : 554-566
- Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F, **2000**. *SOCS3 exerts its inhibitory function on Interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130*. J Biol Chem, 275: 12848-12856.
- Schwartz PH, Bryant PJ, Fuja TJ, Su H, O’Dowd DK, Klassen H, **2003**. *Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex*. J Neurosci Res, 74: 838-851.
- Scolding N, Franklin R, Stevens S, Heldin CH, Compston A, Newcombe J, **1998**. *Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis*. Brain, 121: 2221-2228.
- Seaberg RM & van der Kooy D, **2002**. *Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors*. J Neurosci, 22: 1784-1793.
- Seaberg RM, Smukler SR, van der Kooy D, **2005**. *Intrinsic differences distinguish transiently neurogenic progenitors from neural stem cells in the early postnatal brain*. Dev Biol, 278: 71-85.
- Seldin DC & Leder P. **1995** *Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma : relation to theileriosis in cattle*. Science, 267: 894-897.

- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A, **2001**. *Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus*. J Neurosci, 21: 7153-7160.
- Shi Y, Chichung Lie D, Taupin P, Nakashima K, Ray J, Yu RT, Gage FH, Evans RM, **2004**. *Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells*. Nature, 427: 78-83.
- Shimozaki K, Nakashima K, Niwa H, Taga T, **2003**. *Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of embryonic stem cells in neurogenesis inducing cultures*. Development, 130: 2505-2512.
- Shore LJ, Soler AP, Gilmour SK, **1997**. *Ornithine decarboxylase expression leads to translocation and activation of protein kinase CK2 in vivo*. J Biol Chem, 272: 12536-12543.
- Schumacher A, Arnhold S, Addicks K, Doerfler W, **2003**. *Staurosporine is a potent activator of neuronal, glial, and "CNS stem cell-like" neurosphere differentiation in murine embryonic stem cells*. Mol Cell Neurosci, 23: 669-680.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB, **2003**. *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Research, 63, 5821-5828.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB, **2004**. *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 432: 396-401.
- Slaton JW, Unger GM, Sloper DT, Davis AT, Ahmed K, **2004**. *Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model*. Mol Cancer Res, 2: 712-721.
- Smith AG, **2001**. *Embryo-derived stem cells: of mice and men*. Annu Rev Cell Dev Biol, 17: 435-462.
- Snow MHL, **1977**. *Gastrulation in the mouse: growth and regionalization of the epiblast*. J Embryol Exp Morphol, 42: 293-303.
- Snyder EY, Deitcher DL, Walsh C, Arnold-Aldea S, Hartweg CL, Cepko CL, **1992**. *Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum*. Cell, 68: 33-51.
- Snyder EY, Yoon C, Flax JD, Macklis JD, **1997**. *Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex*. Proc Natl Acad Sci, 94: 11663-11668.
- Solter D & Gearhart J, **1999**. *Biomedicine – Putting stem cells to work*. Science, 283: 1468-1470.
- Solyakov L, Cain K, Tracey BM, Jukes R, Riley AM, Potter BVL, Tobin AB, **2004**. *Regulation of casein kinase-2 (CK2) activity by inositol phosphates*. J Biol Chem, 279: 43403-43410.
- Song DH, Sussman DJ, Seldin DC, **2000**. *Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signalling in mammary epithelial cells*. J Biol Chem, 275: 23790-23797.
- Song DH, Dominguez I, Mizuno J, Kaut M, Mohr SC, Seldin DC, **2003**. *CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of β -Catenin potentiates Wnt signaling*. J Biol Chem, 278: 24018-24025.
- Spassky N, Goujet-Zalc C, Parmantier E, Olivier C, Martinez S, Ivanova A, Ikenaka K, Macklin W, Cerruti I, Zalc B, Thomas JL, **1998**. *Multiple restricted origin of oligodendrocytes*. J Neurosci, 18: 8331-8343.
- Spassky N, Olivier C, Perez-Villegas E, Goujet-Zalc C, Martinez S, Thomas J, Zalc B, **2000**. *Single or multiple oligodendroglial lineages: a controversy*. Glia, 29: 143-148.
- Spassky N, Heydon K, Mangatal A, Jankovski A, Olivier C, Queraud-Lesaux F, Goujet-Zalc C, Thomas JL, Zalc B, **2001**. *Sonic hedgehog-dependent emergence of oligodendrocytes in the telencephalon: evidence for a source of oligodendrocytes in the olfactory bulb that is independent of PDGFR α signalling*. Development, 128 : 4993-5004.
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T, **2001**. *Stem cells find their niche*. Nature, 414: 98-104.
- Stern CD, **2005**. *Neural induction: old problem, new findings, yet more questions*. Development, 132: 2007-2021.
- Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J, **2005**. *Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst*. Development, 132 : 2093-2102.

- Sugano S, Andronis C, Green RM, Wang ZY, Tobin EM, **1998**. *Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the Arabidopsis circadian clock-associated 1 protein*. Proc Natl Acad Sci, 95: 11020-11025.
- Sugano S, Andronis C, Ong MS, Green RM, Tobin EM, **1999**. *The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci, 96: 12362-12366.
- Surani MA, **2001**. *Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance*. Nature, 414: 122-128.
- Tada T, **2006**. *Toti-/pluripotential stem cells and epigenetic modifications*. Neurodegener Dis, 3: 32-37.
- Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, Fujita N, Nakao M, Taga T, **2001**. *DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain*. Dev Cell, 1: 749-758.
- Taupin P & Gage FH, **2002**. *Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals*. J Neurosci Res, 69: 745-749.
- Taverna D & Hynes RO. **2001**. *Reduced Blood Vessel Formation and Tumor Growth in $\alpha 5$ -Integrin-negative Teratocarcinomas and Embryoid Bodies*. Cancer Res. 61, 5255-5261
- Tekki-Kessarri N, Woodruff RH, Hall AC, Pringle NP, Kimura S, Stiles CD, Rowitch DH, Richardson WD, **2001**. *Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the ventral telencephalon*. Development, 128: 2545-2554.
- Temple S & Davis AA, **1994**. *Isolated rat cortical progenitor cells are maintained in division in vitro by membrane-associated factors*. Development, 120: 999-1008.
- Temple S & Alvarez-Buylla A, **1999**. *Stem cells in the adult mammalian central nervous system*. Curr Opin Neurobiol, 9: 135-141.
- Temple S, **2001**. *The development of neural stem cells*. Nature, 414: 112-117.
- Teng YD, Lavik EB, Qu X, Park KI, Ourednik J, Zurakowski D, Langer R, Snyder EY, **2002**. *Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells*. Proc Natl Acad Sci, 99: 3024-3029.
- Theis-Febvre N, Martel V, Laudet B, Souchier C, Grunwald D, Cochet C, Filhol O, **2005**. *Highlighting protein kinase CK2 movement in living cells*. Mol Cell Biochem, 274: 15-22.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM, **1998**. *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 282: 1145-1147.
- Toczyski DP, Galgoczy DJ, Hartwell LH, **1997**. *CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint*. Cell, 90: 1097-1106.
- Tolkunova E, Cavaleri F, Eckardt S, Reinbold R, Christenson LK, Schöler HR, Tomilin A, **2006**. *The Caudal-Related Protein Cdx2 promotes trophoblast differentiation of mouse embryonic stem cells*. Stem Cells, 24:139-144.
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJL, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD, **2001**. *Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin*. Nat Cell Biol, 3: 778-784
- Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A, **2003**. *Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment*. Cerebral Cortex, 13: 580-587.
- Treharne KJ, Crawford RM, Xu Z, Chen JH, Best OG, Schulte EA, Gruenert DC, Wilson SM, Sheppard DN, Kunzelmann K, Mehta A, **2007**. *Protein kinase CK2, Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, and the Δ F508 Mutation. F508 deletion disrupts a kinase-binding site*. J Biol Chem, 282, 10804-10813.
- Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, Van der Kooy D, **2000**. *Retinal stem cells in the adult mammalian eye*. Science, 287: 2032-2036.
- Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, Van Der Kooy D, **2001**. *Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism*. Neuron, 30: 65-78.

- Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL, **2000**. *Direct isolation of human central nervous system stem cells*. Proc Natl Acad Sci, 97: 14720-14725.
- Uchida K, Momiyama T, Okano H, Yuazaki M, Koizumi A, Mine Y, Kawase T, **2005**. *Potential functional neural repair with grafted neural stem cells of early embryonic neuroepithelial origin*. Neurosci Res, 52: 276-286.
- Unger GM, Davis AT, Slaton JW, Ahmed K, **2004**. *Protein kinase CK2 as regulator of cell survival: implications for cancer therapy*. Curr Cancer Drug Targets, 4: 77-84.
- Valero E, De Bonis S, Filhol O, Wade RH, Langowski J, Chambaz EM, Cochet C, **1995**. *Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity*. J Biol Chem, 270: 8345-8352.
- Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SWM, van Lohuizen M, **2004**. *Stem cells and cancer: the Polycomb connection*. Cell, 118: 409-418.
- Vallstedt A, Klos JM, Ericson J, **2005**. *Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain*. Neuron, 45: 55-67.
- Van Laake LW, Hassink R, Doevendans PA, Mummery C, **2006**. *Heart repair and stem cells*. J Physiol, 577 : 467-478.
- Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH, **1999**. *Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice*. Proc Natl Acad Sci, 96 : 13427-13431.
- Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW, **2003**. *Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion*. Nature, 422: 901-904.
- Vignery A, **2000**. *Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism*. Int J Exp Pathol, 81: 291-304.
- Vilk G, Derksen DR, Litchfield DW, **2001**. *Inducible expression of the regulatory protein kinase CK2beta subunit: incorporation into complexes with catalytic CK2 subunits and re-examination of the effects of CK2beta on cell proliferation*. J Cell Biochem, 84: 84-99.
- Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E, **1996**. *Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps*. Blood, 88: 3424-3431.
- Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P, **1997**. *Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies*. Proc Natl Acad Sci, 94: 6273-6278.
- Vogel G, **1999**. *Stem cells – Harnessing the power of stem cells*. Science, 283: 1432-1434.
- Wagers AJ & Weissman IL, **2004**. *Plasticity of adult stem cells*. Cell, 116: 639-648.
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M, **2003**. *Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes*. Nature, 422: 897-901.
- Wang H, Yu S, Davis AT, Ahmed K, **2003**. *Cell cycle dependent regulation of protein kinase CK2 signaling to the nuclear matrix*. J Cell Biochem, 88: 812-822.
- Wang G, Zhang H, Zhao Y, Li J, Cai J, Wang P, Meng S, Feng J, Miao C, Ding M, Li D, Deng H, **2005a**. *Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers*. Bioch Biophys Res Comm, 333: 934-942.
- Wang G, Unger G, Ahmad KA, Slaton JW, Ahmed K, **2005b**. *Downregulation of CK2 induces apoptosis in cancer cells—a potential approach to cancer therapy*. Mol Cell Biochem, 274: 77-84.
- Wang G, Amadh KA, Ahmed K, **2006**. *Role of protein kinase CK2 in the regulation of Tumor Necrosis Factor-related apoptosis inducing ligand-induced apoptosis in prostate cancer cells*. Cancer Res, 66: 2242-2249.
- Warf BC, Fok-Seang J, Miller RH, **1991**. *Evidence for the ventral origin of oligodendrocyte precursors in the rat spinal cord*. J Neurosci, 11: 2477-2488.

- Weinstein DC, Marden J, Carnevali F, Hemmati-Brivanlou A, **1998**. FGF-mediated mesoderm induction involves the *Src-family Laloo*. *Nature*, 394: 904-908.
- Weiss M, Keller G, Orkin S, **1994**. *Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1-embryonic stem cells*. *Nature*, 371: 221-226.
- Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA, **1996**. *Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis*. *J Neurosci*, 16: 7599-7609.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM, **2002**. *Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons*. *Cell*, 110:385-397.
- Wiener F, Fenyo EM, Klein G, Harris H, **1972**. *Fusion of tumour cells with host cells*. *Nat New Biol*, 238: 155-159.
- Williams R, Hilton D, Pease S, Willson T, Stewart C, Gearing D, Wagner E, Metcalf D, Nicola N, Gough N, **1988**. *Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells*. *Nature*, 336: 684-687.
- Wodarz A & Huttner WB, **2003**. *Asymmetric cell division during neurogenesis in Drosophila and vertebrates*. *Mech Dev*, 120: 1297-1309.
- Woodruff RH, Tekki-Kassarlis N, Stiles CD, Rowitch DH, Richardson WD, **2001**. *Oligodendrocyte development in the spinal cord and telencephalon: common themes and new perspectives*. *Int J Devl Neurosci*, 19: 379-385.
- Woodruff RH, Fruttiger M, Richardson WD, Franklin RJM, **2004**. *Platelet-derived growth factor regulates oligodendrocyte progenitor numbers in adult CNS and their response following CNS demyelination*. *Mol Cell Neurosci*, 25: 252- 262.
- Wu Q, Chen X, Zhang J, Loh YH, Low TY, Zhang W, Zhang W, Sze SK, Lim B, Ng HH, **2006**. *Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells*. *J Biol Chem*, 281: 24090-24094.
- Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, Toni N, D'Amour KA, Lie DC, Gage FH, **2004**. *Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage*. *Nature*, 430: 350-356.
- Xin M, Yue T, Ma Z, Wu FF, Gow A, Lu QR, **2005**. *Myelinogenesis and axonal recognition by oligodendrocytes in brain are uncoupled in Olig1-null mice*. *J Neurosci*, 25: 1354-1365.
- Xu X, Toselli PA, Russell LD, Seldin DC. **1999**. *Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II α' catalytic subunit*. *Nat Genet*. 23, 118-121
- Xu X, Cai J, Fu H, Wu R, Qi Y, Modderman G, Liu R, Qiu, M, **2000**. *Selective expression of Nkx2.2 transcription factor in chicken oligodendrocyte progenitors and implications for the embryonic origin of oligodendrocytes*. *Mol Cell Neurosci* 16: 740-753.
- Yao J, Liu Y, Lo R, Tretjakoff I, Peterson A, Stifani S, **2000**. *Disrupted development of the cerebral hemispheres in transgenic mice expressing the mammalian Groucho homologue Transducin-like Enhancer of split 1 in postmitotic neurons*. *Mech Dev*, 93: 105-115.
- Yamada M, Katsuma S, Adachi T, Hirasawa A, Shiojima S, Kadowaki T, Okuno Y, Koshimizu TA, Fujii S, Sekiya Y, Miyamoto Y, Tamura M, Yumura W, Nihei H, Kobayashi M, Tsujimoto G, **2005**. *Inhibition of protein kinase CK2 prevents the progression of glomerulonephritis*. *Proc Natl Acad Sci*, 102: 7736-7741.
- Yang Y, Chen P, Liu Y, **2002**. *Regulation of the Neurospora circadian clock by casein kinase II*. *Gens Dev*, 16: 994-1006.
- Yang Y, Cheng P, He Q, Wang L, Liu Y, **2003**. *Phosphorylation of Frequency by casein kinase II is necessary for the function of the Neurospora circadian clock*. *Mol Cell Biol*, 23: 6221-6228.
- Ye P, Xing Y, Dai Z, D'Ercole AJ, **1996**. *In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors*. *Brain Res Dev Brain Res*, 95: 44-54.
- Ye P, Li L, Richards RG, DiAugustine RP, D'Ercole AJ, **2002**. *Myelination is altered in insulin-like growth factor-I null mutant mice*. *J Neurosci*, 22: 6041-6051.

- Yip S, Sabetrasekh R, Sidmand RL, Snyder EY, **2006**. *Neural stem cells as novel cancer therapeutic vehicles*. Eur J Cancer, 42 : 1298-1308.
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW, **1997**. *AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 90: 5002-5012.
- Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A, **2003**. *BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3*. Cell, 115: 281-292.
- Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA, **2001**. *In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells*. Nature Biotech, 19: 1129-1133.
- Zhang C, Vilk G, Canton DA, Litchfield DW, **2002**. *Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2beta subunit*. Oncogene, 21: 3754-3764.
- Zhang P, Chebath J, Lonai P, Revel P, **2004**. *Enhancement of oligodendrocyte differentiation from murine embryonic stem cells by an activator of gp130 signalling*. Stem Cells, 22: 344-354.
- Zhang J, Tam WL, Tong GQ, Wu Q, Chan HY, Soh BS, Lou Y, Yang J, Ma Y, Chai L, Ng HH, Lufkin T, Robson P, Lim B, **2006**. *Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1*. Nat Cell Biol, 8: 1114-1123.
- Zhou Q, Wang S, Anderson DJ, **2000**. *Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors*. Neuron, 25: 331-343.
- Zhou Q, Gloria Choi G, Anderson DJ, **2001**. *The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2*. Neuron, 31: 791-807.
- Zhou Q & Anderson DJ, **2002**. *The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification*. Cell, 109: 61-73.

**Étude fonctionnelle de la sous-unité régulatrice de la protéine kinase CK2
dans les cellules souches embryonnaires murines :
survie cellulaire, oligodendrogenèse et cancérogenèse.**

La protéine kinase CK2 est un complexe moléculaire dynamique composé de 2 sous-unités catalytiques α et d'un dimère de sous-unités régulatrices β . La structure cristallographique du dimère de CK2 β suggère l'existence de domaines fonctionnels impliqués dans la fonction régulatrice du dimère envers les sous-unités catalytiques, ainsi que dans des interactions avec divers partenaires protéiques. Le dimère de CK2 β représenterait une plate-forme moléculaire, plaçant la protéine au centre d'un réseau de voies de signalisation.

L'invalidation du gène *CK2 β* chez la souris conduit à un défaut de viabilité des cellules souches embryonnaires. Nous avons pu étudier la fonction de différents domaines fonctionnels *in vitro* dans un modèle cellulaire de mort induite et de restauration par transgénèse additionnelle de formes mutées de CK2 β .

Ce système cellulaire repose sur une stratégie d'invalidation conditionnelle du gène CK2 β en utilisant les cellules souches embryonnaires murines (cellules ES). L'abolition de l'expression du gène endogène est létale pour les cellules ES et leur viabilité est restaurée par l'expression exogène de la protéine CK2 β sauvage. Ce modèle de « death-rescue » nous permet d'étudier l'implication de divers domaines de CK2 β dans la survie, la prolifération et la différenciation des cellules souches embryonnaires, en remplaçant la protéine endogène par diverses formes mutées de la protéine.

Parallèlement, l'invalidation conditionnelle du gène chez la souris ciblée dans les précurseurs neuraux a montré que CK2 β est un élément clef dans les voies de signalisation qui contrôlent l'oligodendrogenèse. La différenciation des cellules ES nullizygotes exprimant la protéine exogène sauvage nous a permis de montrer que celle-ci restaure la lignée oligodendrocytaire. Nous avons aussi montré que certains domaines de CK2 β , impliqués dans la fonction régulatrice du dimère, sont des déterminants structuraux cruciaux pour la prolifération des cellules souches neurales et leur progression dans la lignée oligodendrocytaire.

Functional study of the regulating subunit of the protein kinase CK2 in murin embryonic stem cells: cellular survival, oligodendrogenesis and cancerogenesis.

The protein kinase CK2 is a dynamic molecular complex of 2 catalytic subunits α and of a dimer of regulatory subunit β . Crystallographic structure of the CK2 β dimer suggests the existence of functional domains involved in the regulating function of the dimer towards the catalytic subunits, as well as in interactions with various protein partners. The CK2 β dimer would represent a molecular platform, linking the protein to the center of signalling pathway networks.

The knockout of the murin *CK2 β* gene results in a defect of embryonic stem cell viability. We studied the *in vitro* function of different functional domains with the use of a "death-rescue" cellular model of by additional transgenesis of mutants CK2 β .

This cellular system is based on a conditional *CK2 β* gene knockout strategy using murin embryonic stem cells (ES cells). The abolition of the endogenous gene expression is lethal for ES cells and the exogenous expression of the wild-type protein CK2 β rescues their viability. This "death-rescue" model allows us to study the involvement of various domains of CK2 β in the survival, the proliferation and the differentiation of embryonic stem cells.

In parallel, the conditional targeted knockout in murin neural precursors demonstrated that CK2 β is a key element in signalling pathways that control oligodendrogenesis. The differentiation of nullizygotes ES cells expressing the wild-type exogenous protein reveals that wild-type CK2 β rescues the oligodendrocyte lineage. We also showed that some CK2 β domains, linked to dimer regulatory functions, are crucial structural determinants for the proliferation of neural stem cells and their progression into the oligodendrocyte lineage.