



Identification d'une nouvelle fonction oncogénique de BMI1 à travers la répression du gène suppresseur de tumeur CCNG2 : une fenêtre thérapeutique potentielle

Lucas Mourgues

► To cite this version:

Lucas Mourgues. Identification d'une nouvelle fonction oncogénique de BMI1 à travers la répression du gène suppresseur de tumeur CCNG2 : une fenêtre thérapeutique potentielle. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4064 . tel-01204502

HAL Id: tel-01204502

<https://theses.hal.science/tel-01204502>

Submitted on 24 Sep 2015

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

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

THESE
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé – ED85

Mention : Interactions moléculaires et cellulaires

Présentée et soutenue publiquement

par Lucas MOURGUES

le 23 septembre 2014

**Identification d'une nouvelle fonction
oncogénique de BMI1 à travers la répression du
gène suppresseur de tumeur *CCNG2* : une fenêtre
thérapeutique potentielle.**

Membres du jury:

Dr. AUBERGER Patrick	C3M, Nice (France)	Président de jury
Dr. NUNES Jacques	CRCM, Marseille (France)	Rapporteur
Dr. PASQUET Jean-Max	U1035, Bordeaux (France)	Rapporteur
Dr. DJABALI Malek	UMR5088, Toulouse (France)	Examineur
Dr. MARY Didier	C3M, Nice (France)	Directeur de thèse



Résumé

BMI1 est une protéine appartenant à la famille des polycombs impliquée dans la régulation épigénétique de la transcription. Il a été montré que cette protéine est essentielle à la régulation de la prolifération, de la sénescence et du métabolisme ainsi qu'à l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques et cancéreuses. Ce répresseur transcriptionnel au fort potentiel oncogénique est retrouvé surexprimé dans de nombreux types de cancer ; dans le cas de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) le niveau d'expression de BMI1 augmente avec l'aggravation de la pathologie. Cependant, les voies de signalisation impliquées dans sa surexpression et le rôle qu'il joue au sein de cette maladie demeurent méconnus.

En réprimant l'expression de BMI1 par ARN interférence nous avons pu mettre en évidence que ce polycomb était essentiel à la prolifération cellulaire ainsi qu'au potentiel clonogénique des cellules de LMC. Nous avons également démontré pour la première fois que BMI1 soutenait la croissance tumorale à travers la répression d'un processus autophagique délétère pour la cellule cancéreuse. Une approche transcriptomique nous a permis d'identifier la cible transcriptionnelle impliquée dans ce processus, la Cycline G2. En absence de BMI1, cette cycline peut interagir avec la phosphatase PP2A libérant ainsi la PKC ζ qui va alors activer plusieurs kinases impliquées dans le processus autophagique, AMPK α ; ERK1/2 et JNK.

BMI1 ne pouvant être ciblé pharmacologiquement nous nous sommes intéressés au moyen d'affecter sa fonction. Nous avons ainsi pu identifier que sa surexpression dans les cellules de LMC était en grande partie due à l'activité de la PKC δ . Inhiber cette kinase était suffisant pour bloquer l'expression de BMI1.

Nous avons pour finir trouvé une molécule, via une approche bioinformatique, capable de réinduire l'expression de la Cycline G2 dans les cellules de LMC, l'alexidine dihydrochloride. Cette molécule induit une forte autophagie dans les cellules cancéreuses ainsi que de l'apoptose. Elle s'est également montrée capable de resensibiliser à l'imatinib (un inhibiteur de BCR-ABL) une lignée pourtant résistante.

En conclusion, nos résultats ont révélé un tout nouveau rôle pour le polycomb BMI1 dans le maintien de la pathologie de la LMC. De plus, nos travaux ont permis l'identification de deux nouvelles approches permettant de cibler thérapeutiquement les fonctions de cet oncogène.

Summary

The polycomb protein Bmi1 is a major epigenetic regulator. It has been shown that this protein is essential for the regulation of cell proliferation, senescence and metabolism but also self-renewal of hematopoietic and cancer stem cells. This transcriptional repressor, with a strong oncogenic potential, is overexpressed in many types of cancer. In case of Chronic Myeloid Leukemia (CML) the expression level of BMI1 is associated with worsening prognosis. However, the signaling pathways involved in its overexpression and its role in this disease remains unclear.

By using RNAi to repress BMI1 expression we highlighted that this polycomb was essential for proliferation and clonogenicity of CML cells. We also demonstrated, for the first time, that BMI1 supported tumor growth through repression of deleterious cancer cell autophagy. A transcriptomic approach allowed us to identify a transcriptional target involved in this process: the Cyclin G2. In the absence of BMI1, this cyclin can interact with the PP2A phosphatase freeing the kinase PKC ζ which then activates several kinases involved in autophagy: AMPK α , ERK1/2 and JNK.

As BMI1 cannot be pharmacologically targeted, we searched how to affect its function. We were able to demonstrate that its overexpression in CML cells was largely due to the activity of PKC δ : inhibiting this kinase was sufficient to block the expression of BMI1.

Through a bioinformatic approach, we finally found a molecule capable of expression re-induction of Cyclin G2 in CML cells : alexidine dihydrochloride. This molecule induced a high level of autophagy as well as apoptosis in cancer cells. It had also been able to re-sensitize to imatinib a resistant cell line.

In conclusion, our results revealed a new role for the polycomb BMI1 in supporting the CML pathology. Moreover, our work allowed the identification of two new approaches for therapeutically targeting this oncogene functions.

« L'art de la citation est l'art de ceux qui ne savent pas réfléchir par eux-mêmes. »

Voltaire

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, le docteur Didier Mary, pour avoir bien voulu m'encadrer ainsi que pour sa patience. Cela n'a pas toujours été facile pour lui et je suis très heureux d'avoir pu travailler à ses côtés. J'ai beaucoup apprécié nos discussions, qu'elles soient scientifiques ou portant sur d'autres sujets qui nous intéressaient tous deux. Merci également pour avoir toujours été abordable pour mes (nombreuses) questions.

Je remercie les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mon travail : mes deux rapporteurs, les docteurs Jacques Nunès et Jean-Max Pasquet, l'examineur le Dr. Malek Djabali et enfin le président de ce jury le Dr. Patrick Auberger.

Mon projet de thèse a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ainsi que par la Société Française d'Hématologie.

Je remercie également tous les membres de mon équipe. Jean-François pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe qu'il dirige ainsi que Véro qui m'a aidé sur plusieurs techniques et a participé à la correction de mon manuscrit. Je remercie Marielle pour sa gentillesse et ses petits accès de grossièretés qui bien que rares m'ont toujours fait rire ; Dorota et Rodolphe grâce à qui nous avons pu entendre parler d'autres choses que de « cancéro » en data. Je remercie Manu pour son franc-parler ainsi que pour nos apéros-discussions, je regrette qu'ils n'aient été plus nombreux. Je te souhaite de pouvoir continuer à travailler dans ce domaine pour lequel tu montres tant de passion. Je remercie tout particulièrement ma co-thésarde Célia qui m'aura bien fait rire tout au long de cette thèse, que ce soit avec ses « cascades » ou ses fameuses chansons. Elle justifie à elle seule le dicton « qui aime bien, châtie bien » et je lui souhaite le meilleur pour la suite.

Ce fut un plaisir de travailler au sein du module 1 du C3M avec les équipes Ricci et Auberger, qui m'ont beaucoup aidé dans mes projets et que j'ai harcelé de questions lors de nos datas communs. Je tiens également à remercier les différentes personnes ayant participé à l'organisation des JEDNs ces 4 dernières années (Fabien, Justine, Mathilde, Nico et les autres...) ainsi que les personnes avec qui j'ai fait équipe pour l'organisation des séminaires étudiants/post-docs : Caroline, Émilie et bien sûr Laurent (Bon courage Alix). Une petite attention également pour feu la Troupe des Suricates (Caro, Maéva, Guillaume, Papo, Marie B et Marie J) qui a su donner un tout autre sens au mot répétition.

Pour finir, je remercie du fond du cœur Stéphanie qui, malgré sa propre thèse à gérer, a su prendre le temps de m'épauler tout au long de ces années. Elle m'a également apporté une fabuleuse aide technique et logistique pour la plus grande de nos expérimentations, notre petite Charlotte (envers qui je suis d'ailleurs grandement reconnaissant pour avoir si rapidement fait ses nuits).

Table des matières

Résumé	2
Summary	3
Table des matières	7
Table des illustrations	10
Liste des abréviations	11
Avant-propos	15
I. Epigénétique et code histone	22
II. La famille des gènes polycombs (PcG)	25
A. Origine des polycombs	25
B. Composition des PRCs	26
C. Le mode d'action des PcG	32
D. Rôles généraux des polycombs	36
E. Polycombs et cancer	41
III. Bmi1	43
A. Le gène <i>Bmi1</i>	43
B. Souris <i>Bmi1</i> ^{-/-}	45
C. Bmi1 et cellules souches	46
D. Bmi1 et cancer	50
IV. La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)	53
A. Origine de la maladie	53

B.	La LMC en clinique.....	54
C.	La protéine de fusion BCR-ABL.....	56
D.	Modes d'action de BCR-ABL	58
E.	Thérapies.....	60
V.	Cellules initiatrices de cancer (CIC)	65
VI.	Objectif 1 : Caractériser le rôle de BMI1 dans la LMC et identifier ses cibles.....	71
A.	Présentation de l'étude et résumé	71
B.	Manuscrit	73
C.	Conclusion	112
VII.	Objectif 2 : Identification de la voie de signalisation régulant l'expression de BMI1 dans les cellules de LMC.....	113
A.	Présentation de l'étude et résumé	113
B.	Matériels et méthodes	116
C.	Résultats.....	117
D.	Figures et légendes	120
E.	Brève discussion	126
VIII.	Objectif 3 : Recherche de molécules pouvant induire la réexpression de gènes cibles de BMI1 dans les cellules de LMC. ...	128
A.	Présentation de l'étude et résumé	128
B.	Matériels et Méthodes.....	132
C.	Résultats.....	133
D.	Figures et légendes	136
E.	Brève discussion	142

IX. Discussion	144
X. Perspectives.....	153
Bibliographie	159

Table des illustrations

Figure 1. Schéma d'un nucléosome..	23
Figure 2. Le Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2).....	27
Figure 3. Le Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1).....	29
Figure 4. Mode d'action canonique des complexes PRCs.	33
Figure 5. Résolution d'un domaine bivalent au cours de la différenciation..	38
Figure 6. Représentation du gène <i>BMI1</i> humain.....	44
Figure 7. Le locus <i>CDKN2A</i> régule les suppresseurs de tumeurs p53 et RB1.....	47
Figure 8. Schéma de la translocation à l'origine du chromosome de Philadelphie.....	54
Figure 9. Les différents variant du transcrit <i>BCR-ABL</i> ..	58
Figure 10. Mode d'action du Mésylate d'Imatinib..	62
Figure 11. Les cellules souches cancéreuses à l'origine de la résurgence de la maladie.....	66
Figure 12. Cibler l'auto-renouvellement des CSL réduirait les cas de rechutes.....	68
Figure 13. Approche expérimentale.....	114
Figure 14. BCR-ABL régule transcriptionnellement BMI1 dans la lignée cellulaire de LMC K562.	120
Figure 15. Les kinases de la famille SRC et la PKC δ participent à la régulation de l'expression de BMI1 dans les cellules de LMC.	122
Figure 16. Les formes mutantes PKC δ -DN et PKC-CA affectent la régulation de BMI1 et des processus cellulaires qui y sont associés.	124
Figure 17. Mode de fonctionnement du Connectivity Map..	129
Figure 18. Identification via la base de données cmap d'un activateur de la cycline G2 au fort potentiel anti-tumoral.	136
Figure 19. L'alexidine induit de l'autophagie et de l'apoptose dans les cellules K562 et active la voie AMPK α /JNK au détriment de la voie mTOR.	138
Figure 20. L'alexidine induit de l'autophagie et de la mort dans des cellules K562 imatinib résistantes et les resensibilise à l'imatinib.....	140
Figure 21. Modèle de la régulation de BMI1 et de son rôle dans les cellules de Leucémie Myéloïde Chronique.	156

Liste des abréviations

<i>βTrCP</i>	Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase	<i>BMI1</i>	B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site
<i>ABCB1</i>	ATP-binding cassette, sub-family B	<i>CBX</i>	chromobox homolog
<i>ABL</i>	Abelson murine leukemia viral oncogene	<i>CCNG2</i>	cyclin G2 homolog 1
<i>ADP</i>	Adénosine diphosphate	<i>CCR7</i>	chemokine (C-C motif) receptor 7
<i>AEBP2</i>	Adipocyte Enhancer-Binding Protein2	<i>CD34⁺</i>	Cluster of differentiation 34
<i>AGP1</i>	Angiopoietin 1	<i>CDC42</i>	cell division cycle 42
<i>AKT</i>	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1	<i>CDK</i>	cyclin-dependent kinase
<i>AMPK</i>	adenosine monophosphate-Activated protein kinase	<i>CDKN2A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<i>ARNnc</i>	ARN non codant	<i>CDs</i>	Chromodomain
<i>ATF5</i>	activating transcription factor 5	<i>CDT1</i>	chromatin licensing and DNA replication factor 1
<i>ATG</i>	Autophagy related protein	<i>c-FOS</i>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene
<i>ATM</i>	Ataxia Telangiectasia Mutated	<i>ChIP</i>	Chromatin ImmunoPrecipitation
<i>ATP</i>	adenosine triphosphate	<i>CIC</i>	cellule initiateur de cancer
<i>BCL-2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2	<i>CIL</i>	cellule initiateur de leucémie
<i>BCL-6</i>	B-cell CLL/lymphoma 6	<i>cmap</i>	connectivity map
<i>BCL-XL</i>	B-cell lymphoma-extra large	<i>CpG</i>	-C-phosphate-G-
<i>BCOR</i>	BCL6 corepressor	<i>CSC</i>	cellule souche cancéreuse
<i>BcorL1</i>	BCL6 corepressor-like 1	<i>CSE</i>	cellule souche embryonnaire
<i>BCR</i>	breakpoint cluster region	<i>CSH</i>	cellule souche hématopoïétique
<i>BCR-ABL</i>	breakpoint cluster region - abelson murine leukemia	<i>CSL</i>	cellule souche leucémique
<i>BIM</i>	Bcl-2 Interacting mediator of cell death	<i>CSM</i>	cellule souche mésenchymateuse
		<i>CSN</i>	cellule souche neuronale
		<i>CtBP</i>	C-terminal binding protein

CXCR4 Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 4

DNMTs DNA (cytosine-5-)-methyltransferase

E(z) Enhancer of zeste

EBF1 early B-cell factor 1

E-cadhérine epithelial-cadherin

Eed embryonic ectoderm development

EML-1 echinoderm microtubule associated protein like 1

EMT epithelial-mesenchymal transition

ERK1/2 Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2

Esc Extra sex combs

ETV6 Ets Variant 6

EZH2 enhancer of zeste homolog 1/2

FOXO3A forkhead box O3 A

GATA1 GATA Binding Protein 1 (Globin Transcription Factor 1

GTPase guanosine triphosphatase

H1 Histone 1

H2A Histone 2A

H2AX Histone 2AX

H2B Histone 2B

H3 Histone 3

H4 Histone 4

HDAC Histone deacetylases

Hic1 hypermethylated in cancer 1

HIF hypoxia inducible factor

HMT Histone methyltransferases

Hox Homeobox

hTERT human telomerase reverse transcriptase

ICAM intercellular adhesion molecule

IFN α interferon- α

Igfr2 insulin-like growth factor 2 receptor

ITK inhibiteur de tyrosine kinase

JAK Janus Kinase

JARID2 jumonji, AT rich interactive domain 2

JNK C-Jun-Amino-Terminal Kinase Interacting

Kcnq1 potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1

Kcnq1ot1 KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1

kDa KiloDalton

LAL Ph⁺ leucémie aiguë lymphoblastique Chromosome de Philadelphie positive

LAL-B leucémie aiguë lymphoblastique de type B

LAL-T leucémie aiguë lymphoblastique de type T

LAM leucémie aiguë myéloblastique

LMC Leuémie myéloïde chronique

LNC leucémie neutrophilique chronique

MAPK mitogen-activated protein kinase

MDC1 mediator of DNA-damage checkpoint 1

MDM2 Mouse Double Minute 2

MEF mouse embryonic fibroblast

MEK MAP/ERK Kinase

miRNA MicroRNA

Mll Mixed-Lineage Leukemia

MPT	Modification Post-Traductionnelle
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
NAC	N-acétylcystéine
ncRNA	non-codant RNA
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NLS	Nuclear Localization Signal
NUP214	nucleoporin 214kDa
OOCT1	Octamer-Binding Protein 4
p14^{ARF}	protein 14kDa alternate reading frame
p16^{INK4A}	protéine 16kDa CDK4 Inhibitor
p38MAPK	P38 mitogen-activated protein kinases
p53 (TP53)	Tumor Protein 53
PA	phase accéléré
PARP1	poly (ADP-ribose) polymerase 1
PAX5	paired box 5
PB	phase blastique
PC	phase chronique
Pc	Polycomb
PC box	Polycomb box
PcG	Polycomb Group
Pcgf	polycomb group ring finger
PCL	Polycomb like
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PEST	proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T) riche
PGM	progénitrices granulocyte/macrophage
Ph+	Chromosome de Philadelphie

PHC	Polyhomeotic-like
Pho	Pleiohomeotic
PhoRC	Pleiohomeotic Repressvie Complex
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKCδ	Protein Kinase C δ
PKCζ	Protein Kinase C ζ
PLZF	Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger
PML	promyelocytic leukemia
PP2A	protein phosphatase 2 A
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
pRB	Restinoblastoma protein
PRC1	Polycomb Repressive Complex 1
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PRE	Polycomb Response Element
Psc	Posterior sex comb
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate1
RAF	induced Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RARA	retinoic acid receptor, alpha
RAS	Rat sarcoma
RB1	retinoblastoma 1
Rest	RE1-silencing transcription factor
Ring1a/1b	Really Interesting New Gene 1
RING-finger	Really Interesting New Gene 1-Finger
RMC	Reponse Moléculaire Complète
RMM	Réponse Moléculaire Majeure

ROS	Reactive Oxygen Species	STAT	signal transducer and activator of transcription
RSV	Rous Sarcoma Virus	SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
RUNX1	runt-related transcription factor 1	Suz12	Suppressor of zeste 12
/AML1	/Acute Myeloid Leukemia 1	SYK	spleen tyrosine kinase
/CBFβ	/core-binding factor, beta subunit	TOP2	topoisomérase de type 2
RYBP	RING1 and YY1 binding protein	TP53	Tumor protein 53
SALL4	spalt-like transcription factor 4	Trx	Trithorax gene
SAM	Sterile Apha Motif	Wnt	Wingless Integration site
SAPK	Stress-Activated Protein Kinase	Xist	X-inactive specific transcript
SFMBT1	Scm-like with four mbt domains 1	Yaf2	YY1 associated factor 2
SOX2	RY (sex determining region Y)-box 2	Yy1	Yin And Yang 1 Protein
SPI	specificity protein 1	ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1

Avant-propos

Globocan est une étude menée régulièrement par l'International Agency for Research on Cancer (IARC) qui fait partie de l'Organisation mondiale de la santé¹. En 2012, cette étude a permis d'établir des statistiques fiables sur 28 des cancers les plus fréquents et ce dans 184 pays. Selon cette étude, il y a eu au niveau mondial environ 14,1 millions de cas de cancers nouvellement diagnostiqués en 2012. On estime à 8,2 millions le nombre de décès imputables aux pathologies cancéreuses au cours de cette année. Enfin, 32,6 millions de personnes vivaient cette même année avec un cancer diagnostiqué dans les 5 années précédentes. En raison de la croissance démographique ainsi que du vieillissement de la population mondiale ces chiffres sont en constante augmentation.

Les différentes régions du monde ne sont pas affectées de la même façon par les pathologies cancéreuses. L'incidence du cancer est bien plus élevée pour les hommes dans les régions dites « développées » avec un taux pouvant monter jusqu'à 365 cas pour 100 000 en Océanie contre « seulement » 79 en Afrique de l'ouest. Bien que l'incidence des cancers entre ces deux régions du monde varie de plus de 450% le taux de mortalité ne diffère lui que de 15%. Cette incidence élevée dans les parties du monde les plus développées est certainement imputable à une espérance de vie globalement plus importante. En 2010, plus de 50% des cancers nouvellement diagnostiqués en France l'ont été chez des personnes ayant plus de 65 ans. Le mode de vie occidental favorise également l'exposition aux facteurs de risques cancéreux, le tabagisme en étant le plus dramatique exemple. À l'inverse, bien que l'incidence des cancers soit plus faible dans les régions du monde les moins développées leur dépistage reste tardif et la population n'a pas accès à la même qualité de soin que dans d'autres régions du monde.

En France les pathologies cancéreuses représentent la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme (après les maladies cardio-vasculaires). Les études épidémiologiques estiment à 32% le risque de développer un cancer avant 75 ans en France.

¹ Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 25/06/2014.

Brève histoire de la cancérologie²

Les cancers sont considérés comme un fléau de santé publique propre à nos sociétés actuelles, prenant source dans nos modes de vie, le vieillissement de la population et l'exposition à des agents cancérogènes émanant de nos industries. Pourtant les pathologies cancéreuses existaient déjà il y a plusieurs milliers d'années et cela fait plusieurs siècles que les efforts des praticiens de la médecine et des chercheurs sont portés vers une meilleure compréhension de ces pathologies.

Plusieurs papyrus égyptiens datant de 3 000 à 2 000 avant J.-C. décrivent des tumeurs du sein traitées à l'époque par cautérisation. Une récente étude a également permis de révéler la présence de lésions osseuses imputables à un carcinome métastatique sur le squelette d'un jeune homme datant de 3 200 ans (Binder et al., 2014). Les premières notions de cancérologie ainsi que les termes « cancer » et « carcinome » nous viennent d'Hippocrate à la fin du V^{ème} siècle. Depuis cette ère, la perception du cancer et les hypothèses quant à son origine n'ont cessé d'évoluer. Jusqu'au XIX^{ème} siècle la nature cellulaire des organismes n'était pas connue et ainsi plusieurs théories se sont succédées pour définir la nature du tissu cancéreux.

La théorie des humeurs :

La théorie sur l'origine humorale de la pathologie, popularisée par Hippocrate à la fin du V^{ème} siècle av. J.-C, a ainsi prévalu durant près de 2 000 ans. La théorie des humeurs de la Grèce antique veut que la santé du corps et de l'esprit soit influencée par l'équilibre des quatre humeurs (ou fluides) présentes dans le corps. On retrouve ainsi le sang produit par le foie puis reçu par le cœur, la pituite (plus tard appelée lymphe) liée au cerveau, la bile jaune venant également du foie et enfin la bile noire (ou atrabile) provenant de la rate. À cette époque, les pathologies néoplasiques étaient sensées prendre leur source dans un excès de bile noire. Plus tard, l'origine tumorale sera attribuée à une production de bile noire par le foie en raison d'une augmentation de la température. La rate ne pouvant la résorber, celle-ci contribuerait à épaissir le sang qui, en stagnant dans les tissus, provoquerait le développement de la tumeur. Une autre théorie voudrait que la bile noire se solidifie directement dans un organe et constitue ainsi une tumeur.

² L'historique ici présenté s'inspire de Barthelmé, E. (1981). Histoire de la notion du cancer. Histoire des Sciences médicales 15, 167-172. pour la partie allant jusqu'au XX^{ème} siècle. Puis de la série d'articles *Milestone in Cancer* publiés par le groupe *Nature*.

À la renaissance la théorie humorale est mise à mal par André Vésale qui parvient à réfuter l'existence de la bile noire et de nouvelles théories voient alors le jour. On attribue pendant un temps l'origine tumorale à l'action du sel, l'un des trois principes alchimiques avec le mercure et le soufre. D'autres théories font intervenir des forces immatérielles comme l'archeus.

Quand le système lymphatique fut découvert au XVII^{ème} siècle par Jean Pecquet la théorie humorale revint en force en substituant la lymphe à la bile noire. On estime alors que l'origine de la tumeur découle de la fermentation de la lymphe, de sa dégénérescence ou plus tard encore de sa coagulation. La découverte du système lymphatique a tout de même permis dès la première moitié du XVIII^{ème} siècle au chirurgien Henri François Le Dran d'évoquer la pathologie cancéreuse comme débutant de façon locale dans un tissu bien spécifique avant de se propager par voie lymphatique à d'autres tissus. Il préconisait ainsi l'excision de la tumeur ainsi que des ganglions lymphatiques afférents.

Comme mentionné précédemment, la découverte au début du XIX^{ème} siècle de la nature cellulaire des organismes par Mathias Jakob Schleiden et Theodor Schwann permit à un professeur de l'université de Bonn de réfuter la théorie de la lymphe coagulée. Johannes Peter Müller sera ainsi le premier à déterminer que les cancers sont des masses cellulaires. Plus tard, Rudolph Virchow, un des élèves de Müller, suggèrera en 1858 que les cellules sont nécessairement issues d'autres cellules permettant ainsi de relier les pathologies cancéreuses aux cellules du tissu sain correspondant.

Tout comme la nature de la pathologie, ses causes ont longtemps été débattues. Le fait que le terme cancer regroupe en fait des pathologies néoplasiques parfois très différentes et causées par des facteurs multiples a renforcé la difficulté de leur étude.

Les causes des pathologies cancéreuses :

Dès 1775, Percivall Pott observe chez les ramoneurs une fréquence élevée de cancer du scrotum et postule pour une origine chimique. Il faudra par la suite attendre 1915 pour que Katsusaburō Yamagiwa introduise la notion de substance cancérogène. Au début du XIX^{ème} siècle, Karel Rokitansky évoque la notion de prédisposition, héréditaire ou acquise, favorisant le développement de cancers. En 1896, Hugo Ribbert propose une cause mécanique au développement de tumeurs. Selon cette théorie la prolifération aberrante des cellules tumorales prendrait sa source dans les mécanismes de réparation tissulaire faisant suite à un traumatisme.

Le début du XX^{ème} siècle voit la théorie suggérant que les cancers tirent leur origine d'agents infectieux prendre une ampleur considérable. Le pathologiste danois Johannes Fibiger apporte la plus importante pierre à cet édifice en publiant une étude selon laquelle une alimentation contaminée par un nématode, qu'il appellera *Spiroptera neoplastica*, est capable d'induire des tumeurs gastriques malignes chez le rat. Bien qu'ils lui aient valu de se voir discerner un prix Nobel de médecine en 1926 les travaux de Fibiger se sont révélés impossibles à reproduire sonnant ainsi le glas de la théorie parasitaire pour l'origine des cancers.

Oncogène et suppresseur de tumeur :

C'est à la même période, en 1910, que Peyton Rous découvre une tumeur aviaire (un sarcome fusocellulaire) qui peut être transplantée dans un hôte secondaire, la première de ce type. Un an plus tard, Rous réédite cette expérience mais en utilisant cette fois-ci un filtrat obtenu à partir des cellules tumorales. Ce filtrat, ne contenant aucune cellule intacte, est capable d'induire le développement d'une tumeur dans un second hôte. L'agent cancérigène présent dans ce filtrat a par la suite été identifié comme étant un virus qui porte à présent le nom de Rous Sarcoma Virus (RSV). La charge virale (concentration en virus) a directement été corrélée à l'incidence tumorale dans plusieurs lignées murines. C'est vers la fin des années 70s que J. Michael Bishop et Harold E. Varmus parviennent à identifier un homologue cellulaire à la séquence codée par le RSV (v-Src) chez l'homme. Cette découverte, récompensée d'un prix Nobel en 1989, est ainsi la première preuve de l'existence de gènes reliés à la cancérogénèse chez les vertébrés, les oncogènes. Au début des années 80s, plusieurs groupes mettent en évidence que ces oncogènes non viraux sont des gènes cellulaires ayant subi des mutations leur conférant un potentiel transformant, oncogénique. C'est le cas pour l'oncogène *RAS* dont la mutation d'une glycine en valine à la position 12, rendant la protéine constitutivement active, a été identifiée en 1982.

Les années 70/80 ont vu la recherche sur les oncogènes rétroviraux et cellulaires dominer le domaine de la cancérologie. Toutefois, plusieurs observations ne semblent pas coller totalement avec le modèle de l'époque qui veut que l'altération d'un seul allèle d'un oncogène soit suffisante pour initier un phénotype cancéreux. Ainsi Henry Harris, en fusionnant une cellule originaire d'une souris saine à une cellule cancéreuse, a montré que les « gènes sains » pouvaient être dominants sur les « cancéreux », la cellule de fusion présentant en effet un phénotype sain. Cette étude a ouvert la voie à l'hypothèse formulée par David Comings en 1973 qui évoquait que la pathologie cancéreuse pouvait découler d'une altération homozygote de gènes ayant un rôle de

suppresseur de tumeur. Ce n'est qu'une décennie plus tard que l'équipe de Webster Cavanee identifie le gène suppresseur de tumeur rétinoblastome (*RBI*) dont la mutation homozygote est retrouvée dans plusieurs types de cancer. Peu de temps après c'est au tour de *TP53* d'être identifié comme gène suppresseur de tumeur.

Les notions d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur ont représenté une avancée formidable pour l'identification des étapes de la cancérogénèse ainsi que pour la mise en place de thérapies plus efficaces. On peut également ajouter à ces précédentes découvertes la compréhension du rôle de l'angiogénèse et du micro-environnement dans le développement et le maintien de la tumeur. Pour finir l'identification de l'altération des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la mort cellulaire, retrouvée dans les cellules cancéreuses, a joué un rôle prépondérant dans l'élaboration de nouvelles thérapies.

Le concept de cellules souches cancéreuses (CSC) :

Les thérapies anticancéreuses développées dans les années 90s sont devenues très efficaces pour éliminer les cellules tumorales de nombreux types de cancers. Toutefois même si ces traitements apparaissent efficaces au premier abord, les cas de rechutes restent extrêmement fréquents même plusieurs années après que les patients soient entrés en rémission. On sait aujourd'hui que ces cas de rechutes sont associés à la présence de cellules souches cancéreuses (CSC) ou cellules initiatrices de cancers (CIC).

Le concept de CSC a pour la première fois été proposé en 1937 par Jacob Furth et Morton Kahn. Dans une étude portant sur la leucémie ils ont montré que la transplantation de cellules issues d'une lignée cancéreuse était capable d'initier la pathologie dans une souris. Ils ont alors postulé que certaines cellules, au sein de la population cancéreuse, possèdent la capacité d'initier la croissance d'une nouvelle tumeur. La mise au point des premiers tests de clonogénicité dans les années 60/70 ont permis de montrer que seule une fraction de la population cancéreuse avait la capacité de former une colonie en milieu semi-solide. Ce n'est qu'en 1994 que l'équipe de John Dick permettra de mettre en évidence le modèle hiérarchique de la population cancéreuse. Ce modèle montre que la majorité des cellules cancéreuses proliférantes sont issues d'une minorité de cellules partageant certaines capacités avec les cellules souches comme l'auto-renouvellement. Cette étude identifiera également les marqueurs spécifiques permettant l'identification de la population souche au sein de la leucémie aiguë myéloïde.

Une grande part des agents thérapeutiques utilisés visent plus particulièrement les cellules en prolifération active ou bien encore les cellules ayant un fort métabolisme, ce qui est le cas des cellules cancéreuses. Toutefois, même si la très grande majorité de la population cancéreuse répond bien aux critères mentionnés plus haut ce n'est pas le cas des CSC. De plus, ces cellules se trouvent bien souvent au sein de niches difficiles d'accès aux agents thérapeutiques. Les CSC sont à l'origine des cas de rechutes de la pathologie : elles seules sont capables de générer une nouvelle population cancéreuse et de la maintenir sur le long-terme (propriété d'auto-renouvellement).

L'un des principaux enjeux actuels dans le domaine de la cancérologie est de prévenir les cas de rechutes dont les CSC sont responsables. Pour cela une meilleure compréhension de ces cellules et des facteurs participant à leur maintien est nécessaire.

Introduction

I. Epigénétique et code histone

Bien que possédant le même patrimoine génétique les cellules d'un organisme remplissent des fonctions très diverses nécessitant un contrôle fin et spécifique des gènes exprimés. Cette régulation stricte de l'expression génique en fonction du type cellulaire et de l'environnement de la cellule est en partie assurée par la régulation épigénétique.

L'épigénétique regroupe plusieurs mécanismes permettant l'activation ou la répression de gènes que ce soit de façon stable ou dynamique sans changement des séquences nucléotidiques. Parmi ces mécanismes on retrouve la méthylation de l'ADN au niveau des résidus cytosines des îlots CpG, la compaction de la chromatine rendant accessible ou non les gènes cibles pour la machinerie transcriptionnelle, les ARN non codants (ARNnc) et enfin les modifications post-traductionnelles des histones. L'ensemble de ces processus sont liés et collaborent dans la régulation épigénétique du génome.

Dans les cellules eucaryotes l'ADN n'est pas laissé libre dans le noyau ; plusieurs protéines interagissent en effet avec le matériel génétique et permettent ainsi de former une structure organisée. L'association du matériel génétique avec ces protéines forme ce que l'on appelle la chromatine. Celle-ci peut se trouver en plusieurs états de compactions permettant l'accessibilité ou non aux séquences nucléotidiques. Un état extrêmement compact appelé hétérochromatine est généralement associé à des parties transcriptionnellement inactives de la chromatine. À l'inverse, l'euchromatine consiste en une organisation plus lâche et est associée traditionnellement à une forte activité transcriptionnelle.

La structure de base de la chromatine est le nucléosome. Un nucléosome est constitué d'un complexe octamérique d'histones autour duquel s'enroule la molécule d'ADN (environ 147 paires de bases par nucléosome). Le complexe protéique est constitué de 2 copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. Une cinquième histone (H1), dite de liaison, se lie à l'ADN au niveau de son entrée et de sa sortie du nucléosome permettant ainsi de verrouiller la structure ([Figure 1](#)). Les nucléosomes sont séparés les uns des autres par une séquence d'ADN dont la taille peut varier selon les espèces : elle est d'environ 80 pb chez l'homme. La chromatine peut ainsi être comparée à un collier de perles donc chaque perle représente un nucléosome.

Ce sont les histones qui sont à l'origine de la compaction de la chromatine. En effet, les histones sont de petites protéines (environ 15 kDa) dont la partie C-terminale, de forme globulaire, compose le cœur du nucléosome. Leur extrémité N-terminale forme une «queue» qui est le siège principal des nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT) permettant les interactions protéiques à l'origine de la compaction de la chromatine (Figure 1). L'ensemble de ces MPT constitue ce que l'on appelle le « code histone » qui détermine les gènes qui doivent ou pas être transcrits.

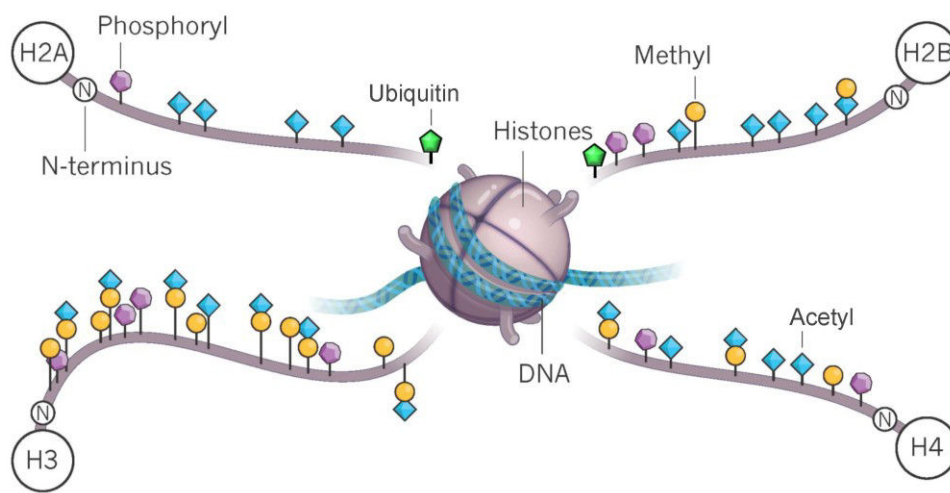


Figure 1. Schéma d'un nucléosome. Le nucléosome est le constituant de base de la chromatine, il est composé d'un octamère protéique d'histones (2xH2A, 2xH2B, 2xH3 et 2xH4) représenté ici en violet. La molécule d'ADN (en bleu) s'enroule autour des histones (≈ 147 pb) formant ainsi le nucléosome. Les queues d'histones sont également représentées avec les modifications post-traductionnelles les plus connues : la phosphorylation, la méthylation, l'acétylation et l'ubiquitination. Figure adaptée d' Helin and Dhanak, 2013.

Les MPT des histones sont nombreuses, les principales étudiées sont :

- L'acétylation de résidus lysine, que l'on peut retrouver sur toutes les histones, notamment l'histone H3 (H3K9ac, H3K14ac et H3K27ac). L'acétylation limite de manière générale les interactions inter-nucléosomes ainsi que celles entre les queues d'histones ce qui se traduit par un relâchement de la chromatine et donc par un état actif de celle-ci.
- La méthylation de résidus lysine ou arginine des histones. Ces résidus peuvent se trouver mono-/di-/ou tri-méthylés. L'effet de cette méthylation dépend de l'acide aminé concerné ainsi que du niveau de méthylation. Par exemple la mono- et la tri-méthylation de l'H3 sur

le résidu lysine 4 (H3K4me1/H3K4me3) sont associées à une transcription active, tout comme la marque H3K27me1. À l'inverse les di- et tri-méthylation du résidu H3K27 sont associées à la répression de la transcription.

- La phosphorylation qui peut concerner les résidus sérine, thréonine ou encore tyrosine. La phosphorylation sur le résidu sérine H2AX139 est par exemple un marqueur des cassures double brins de l'ADN et représente un élément clé du recrutement de la machinerie de réparation des dommages à l'ADN. La phosphorylation H2BS14, elle, est associée à la compaction de la chromatine lors de processus apoptotiques.
- L'ubiquitination de résidus lysine que l'on retrouve en position 119 sur H2A et 120 sur H2B. La marque H2B120ub1 semble nécessaire à la méthylation de l'histone H3 et pourrait jouer un rôle de suppresseur de tumeur alors que la marque H2A119ub1 est associée à la répression transcriptionnelle et à la progression tumorale.

Les études des histones et de leurs MPT a révélé l'existence de nombreuses autres modifications, dont on commence tout juste à comprendre le rôle et le lien avec celles précédemment étudiées, ce qui complexifie énormément ce fameux code histone. Parmi ces MPT on retrouve entre autres la sumoylation, l'ADP-ribosylation, la propionylation, la palmitoylation, la biotinylation, la malonylation, etc... (Rothbart and Strahl, 2014 pour revue). L'ensemble de ces MPT n'est pas nécessairement transmissibles à la génération cellulaire suivante comme le laisse entendre la définition de l'épigénétique. En effet, certaines de ces marques sont présentes seulement ponctuellement en réponse à un stress comme par exemple la phosphorylation de l'histone H2AX qui fait suite à une cassure double brin de l'ADN (Rogakou et al., 1998). Des modifications ponctuelles se retrouvent aussi lors de la mise en place de processus bien spécifiques comme par exemple la phosphorylation en H3S10 qui est impliqué dans les processus de mitose et de méiose (Hendzel et al., 1997).

L'une des principales classes de modificateurs d'histones est représentée par la famille des polycombs (PcG) qui est à l'origine de la tri-méthylation d'H3K27 et de la mono-ubiquitination d'H2AK119. Ces marques histones jouent un grand rôle dans la répression transcriptionnelle et sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires que ce soit au sein des cellules souches embryonnaires, adultes ou des cellules différenciées. De plus, l'altération

de la fonction de ces protéines est associée à plusieurs pathologies dont la plupart sont des cancers.

II. La famille des gènes polycombs (PcG)

A. Origine des polycombs

Les protéines du groupe polycombs (PcG) agissent au sein de complexes multimériques capables de modifier le code histone au niveau de gènes cibles entraînant ainsi leur répression transcriptionnelle. Ces complexes sont de tailles très variables car de nombreux co-facteurs peuvent interagir avec le noyau du complexe selon le type cellulaire, le niveau de différenciation ainsi que le contexte environnemental. Les protéines composant le noyau et indispensables au bon fonctionnement du complexe ont été identifiées pour la première fois chez *Drosophila melanogaster* comme étant des régulateurs-clés de l'expression des gènes homéotiques (*HOM-C* ou *Hox*, son homologue chez la souris) (Lewis, 1978). Les gènes homéotiques sont impliqués dans la mise en place de l'identité cellulaire le long de l'axe antéro-postérieur durant l'embryogénèse, la régulation précise de leur expression est donc essentielle au bon développement de l'organisme. Les complexes protéiques PcG et Trithorax (Trx) sont responsables respectivement de la répression et de l'activation de ces gènes homéotiques; ils forment ainsi une balance permettant une expression spatio-temporelle de ces gènes en fonction du devenir de la cellule. Des mutations des gènes *PcG* ou *Trithorax* chez la drosophile occasionnent des défauts de segmentation le long de l'axe antéro-postérieur (Ringrose and Paro, 2004). Des souris déficientes pour le gène *Mll* (un homologue de *Trithorax*) ou pour *Bmi1* (appartenant au PcG) présentent une altération du pattern d'expression d'*Hox*, alors que les souris déficientes pour ces deux gènes à la fois voient leur expression d'*Hox* normalisée démontrant ainsi les rôles antagonistes de ces deux gènes (Hanson et al., 1999).

Les protéines PcGs sont regroupées au sein de deux complexes principaux appelés Polycomb Repressive Complexe 1 et 2 (PRC1 et PRC2). Le PRC2 est responsable de la tri-

méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) qui est associée au recrutement du PRC1 qui induit la mono-ubiquitination de la lysine H2A sur le résidu lysine en position 119. Un troisième complexe appelé Pleiohometric Repressive Complex (PhoRC) a été identifié chez la drosophile comme étant impliqué dans le recrutement des PRCs au niveau de la chromatine.

B. Composition des PRCs

Le PRC2 chez *Drosophila melanogaster* :

Chez la drosophile le PRC2 est composé d'un noyau de trois sous-unités sans lesquelles le complexe ne peut être totalement fonctionnel. Ces sous-unités sont codées par les gènes Enhancer of zeste (E(z)), Suppressor of zeste 12 (Suz12) et Extra sex combs (Esc) (Figure 2). La protéine E(z) fait partie de la superfamille des protéines possédant un domaine SET qui est nécessaire à l'activité méthyltransférase de ces protéines. En effet, les protéines de cette famille ont pour rôle de méthyler des résidus lysines présents au niveau des queues d'histones, d'où leur nom d'histones méthyltransférases (HMT). Chaque protéine à domaine SET va méthyler une cible bien spécifique ; pour E(z) c'est principalement la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) et plus rarement celle de la lysine 9 (H3K9me3) (Cao et al., 2002; Czermin et al., 2002; Muller et al., 2002). Suz12 possède un domaine à doigt de zinc et est nécessaire à la liaison du complexe au nucléosome. Esc possède un domaine WD40 (un motif d'environ 40 acides aminés retrouvé sur les dipeptides tryptophane-acide aspartique, W-D) et a pour rôle de stimuler l'activité HMT d'E(z) (Ketel et al., 2005). E(z) semble en effet catalytiquement inactive lorsqu'elle n'est pas associée à ses partenaires *in vitro* (Cao and Zhang, 2004a).

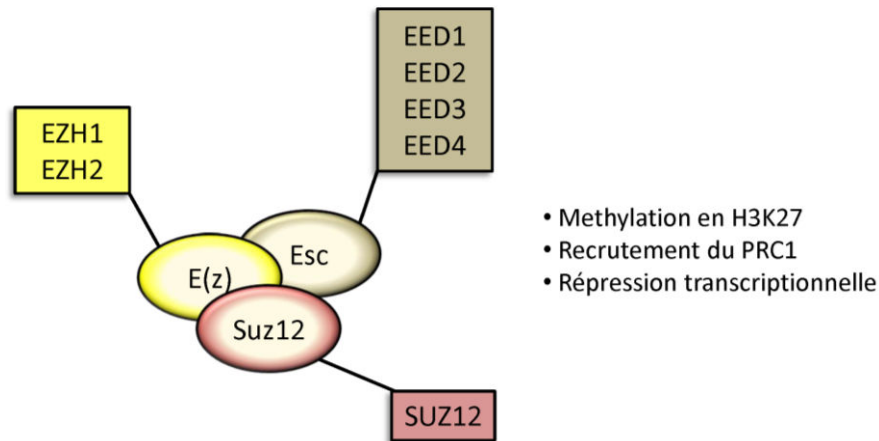


Figure 2. Le Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). Les protéines constituant le cœur du PRC2 chez *Drosophila melanogaster* sont représentées au centre du schéma : E(z), Esc et Suz12. Pour chacune de ces protéines les paralogues constituant le PRC2 retrouvés chez les mammifères sont indiqués dans les cadres en périphérie : EZH1/2, EED1/2/3/4 et SUZ12. Figure adaptée de Di Croce and Helin, 2013.

Le PRC2 chez les mammifères:

Chez les mammifères le noyau du complexe est composé des paralogues des gènes trouvés chez la drosophile auxquels peuvent s'ajouter de façon facultative d'autres protéines. On y retrouve ainsi l'un des deux paralogues d'E(z), Ezh1 ou Ezh2, Suz12 et l'une des isoformes d'Eed (Eed1-4) paralogues d'Esc (**Figure 2**).

Plusieurs indices semblent indiquer que le PRC2 a des fonctions différentes selon qu'Ezh1 ou Ezh2 soit présent dans le complexe. Le domaine catalytique SET est très conservé entre ces deux gènes (Whitcomb et al., 2007) et ils possèdent tous deux une activité de mono-, di- et tri-méthylation. En comparaison d'Ezh2, Ezh1 possède toutefois une activité HMT plus faible *in vitro* (Margueron et al., 2008). Les PRC2 contenant Ezh1 ou Ezh2 ont des fonctions répressives différentes et complémentaires dans les cellules souches embryonnaires (CSE) (Margueron et al., 2008; Shen et al., 2008). La présence d'Ezh1 peut cependant compenser la perte d'Ezh2 au sein de ces cellules en maintenant environ le tiers des marques H3K27me3 par rapport aux cellules exprimant les deux. Cette complémentarité entre les complexes composés d'Ezh1 et d'Ezh2 a également pu être observée dans les cellules souches de la peau et les cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Ezhkova et al., 2011; Mochizuki-Kashio et al., 2011).

En plus des protéines composant le noyau du complexe, des co-facteurs interagissent de manière étroite avec celui-ci et sont capables d'optimiser son activité. Il est toutefois difficile de les inclure dans le noyau du complexe car leur présence est dispensable et dépend le plus souvent du type et du contexte cellulaire. Parmi ces protéines on retrouve :

- AEBP2, une protéine à motif Ring Finger qui participe à la stimulation de l'activité méthyl transférase du complexe PRC2 *in vitro* et pourrait également être capable de participer au ciblage d'une partie des gènes cibles du PRC2 (Cao and Zhang, 2004b; Kim et al., 2009).
- Les différents orthologues du gène polycomb-like (*Pcl*) de la drosophile : PCL1/PHF1, PCL2/MTF2 et PCL3. Tout comme AEBP2 ces protéines semblent impliquées dans la stimulation de l'activité d'EZH2 et potentiellement dans le recrutement du PRC2 auprès de ses cibles. La présence des protéines PCL est tissu dépendante chez les mammifères (Nekrasov et al., 2007).
- JARID2 appartenant à la famille des protéines Jumonji, bien qu'elle ne partage pas le domaine nécessaire à l'activité déméthylase des histones propre à cette famille. JARID2 interagit directement avec EZH2 et semble à la fois capable de stimuler ou d'inhiber son activité. Cette protéine participe également au recrutement du PRC2 au sein des cellules souches embryonnaires (Herz and Shilatifard, 2010 pour revue).

[Le PRC1 chez *Drosophila melanogaster* :](#)

Le PRC1 a été lui aussi initialement caractérisé chez la drosophile (Saurin et al., 2001; Shao et al., 1999). Le noyau du complexe est composé de la protéine Polycomb (Pc), dRing, Posterior sex combs (Psc) et Polyhomeotic (Ph) ([Figure 3](#)). Pc possède un chromodomaine en N-terminal et une Pc box en C-terminal. Les chromodomaines sont retrouvés dans de nombreuses protéines capables de s'associer à la chromatine et sont connus pour reconnaître et s'associer aux résidus lysines méthylés (Eissenberg, 2001). Le chromodomaine de Pc se lie plus spécifiquement à la modification post-traductionnelle H3L27me3, générée par le PRC2 (Fischle et al., 2003; Min et al., 2003). La Pc box représente un motif d'environ 15 acides

aminés nécessaire à l'interaction avec dRing ainsi qu'à la fonction répressive du PRC1 (Muller et al., 1995).

L'activité enzymatique du PRC1 est supportée par la protéine dRing, appartenant à la famille des E3 ubiquitine ligase, responsable de la mono-ubiquitination de l'histone H2A sur la lysine 119 (H2AK119ub) (Wang et al., 2004a). Cette modification post-traductionnelle de H2A est très importante pour la répression des gènes ciblés par les PcGs.

Psc, tout comme dRing, est une protéine possédant un domaine RING-finger. Ces protéines sont souvent associées aux enzymes de l'ubiquitination, dont elles stimulent l'activité ligase, ainsi qu'à leur substrat (Joazeiro and Weissman, 2000). Bmi1, un homologue murin et humain de Psc, stimule l'activité d'ubiquitination de l'homologue de dRING (Ring1a/1b) *in vitro* et *in vivo* (Buchwald et al., 2006; Cao et al., 2005). Pc est également responsable de la compaction de la chromatine (Francis et al., 2004).

La fonction précise de Ph au sein du complexe PRC1 n'est pas encore bien caractérisée. Toutefois il a été supposé que Ph pourrait être responsable de la polymérisation du complexe PRC1 via son Sterile Alpha Motif (SAM) (Kim et al., 2002).

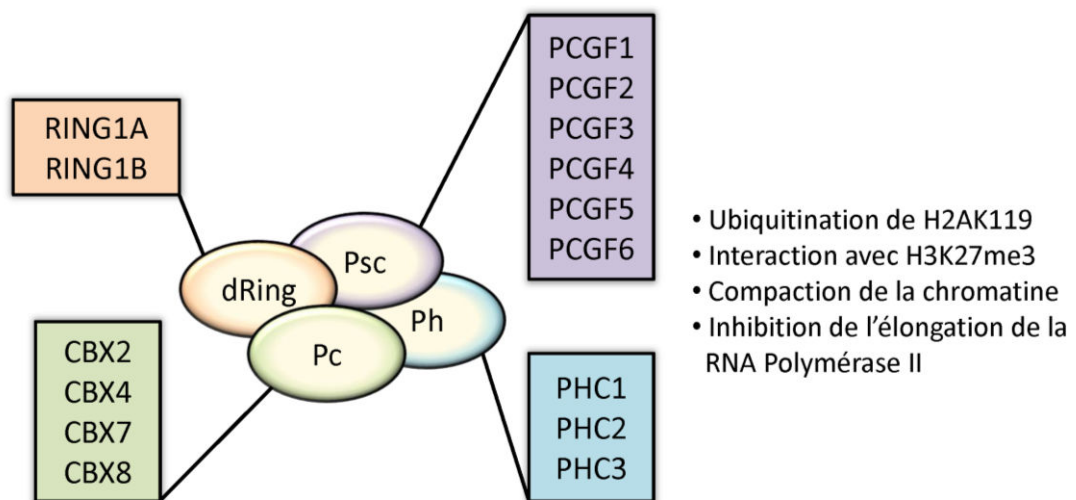


Figure 3. Le Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1). Les protéines constituant le cœur du PRC1 chez *Drosophila melanogaster* sont représentées au centre du schéma : dRing, Psc, Ph, Pc. Au cours de l'évolution les protéines composant le PRC1 ont connu une grande diversification. L'ensemble des paralogues des gènes de la drosophile retrouvés chez les mammifères sont représentés dans les cadres autour : RING1A/B, CBX2/4/7/8, PHC1/2/3 et enfin PCGF1/2/3/4/5/6. Figure adaptée de Di Croce and Helin, 2013.

Le PRC1 chez les mammifères :

La composition du PRC1 chez les vertébrés est beaucoup plus complexe. En effet, on retrouve fréquemment au cours de l'évolution le processus de duplication de gènes suivi d'une divergence des séquences codantes. Ainsi les gènes de la famille *Hox* sont regroupés en un seul cluster chez l'oursin ou la drosophile. Chez les vertébrés ces gènes sont plus nombreux et regroupés en plusieurs clusters, localisés sur des chromosomes différents (Finnerty and Martindale, 1998). De la même façon on retrouve chez les vertébrés, et plus encore chez les mammifères, plusieurs homologues pour chacun des gènes polycomb impliqués dans la formation du PRC1 initialement décrit chez la drosophile ([Figure 3](#)) (Levine et al., 2002; Shao et al., 1999).

On retrouve ainsi deux homologues de dRing chez les mammifères, Ring1A et Ring1B (anciennement nommés Ring1 et 2) qui tout comme dRing semblent être responsables de la mono-ubiquitination H2AK119ub établie par le PRC1. Bien que possédant des séquences très proches ces gènes semblent jouer des rôles distincts comme le montre la différence entre les phénotypes développés par les souris déficientes pour l'un ou l'autre de ces deux gènes. Les souris hétérozygotes pour Ring1A présentent des défauts de développement au niveau de l'axe antérieur ainsi que des anomalies du squelette classiquement attribués à une déficience des gènes de la famille Hox (del Mar Lorente et al., 2000). En revanche, les souris déficientes pour Ring1B ne présentent aucune anomalie squelettique mais développent une gastrulation anormale qui aboutit à des embryons non viables passé le dixième jour de l'embryogénèse (Voncken et al., 2003). La différence de sévérité de ces phénotypes peut s'expliquer par le fait qu'une déficience en Ring1B réduit drastiquement la marque H2AK119ub globale contrairement au knockout de Ring1A, comme c'est le cas dans les cellules souches embryonnaires (de Napoles et al., 2004).

Il existe 5 homologues du gène Pc chez les mammifères, appelés Chromobox (Cbx) qui ont été identifiés grâce aux motifs CDs et PC box très fortement conservés (>75% de similarité avec la séquence d'acides aminés de la molécule Pc chez la drosophile) présents dans leur séquence. Cbx2, Cbx4, Cbx7 et Cbx8 sont connus pour fonctionner au sein du PRC1 contrairement à Cbx6 (Vandamme et al., 2011). Ces gènes, bien que possédant des domaines en commun, présentent de grandes divergences sur le reste leur séquence se traduisant par des fonctions cellulaires pouvant varier d'un paralogue à l'autre. Ainsi leur

affinité pour la marque de répression H3K27me3 et les partenaires polycombs avec lesquels ils interagissent peuvent varier (Bernstein et al., 2006b; Vandamme et al., 2011). Cbx4 est par exemple le seul homologue de Pc à avoir acquis un motif de liaison au facteur de répression transcriptionnel C-terminal binding protein (CtBP) (Sewalt et al., 1999). Une autre particularité de Cbx4 est de posséder une activité E3 SUMO ligase qui aurait pour cible plusieurs régulateurs transcriptionnel incluant CtBP (Kagey et al., 2003; Wotton and Merrill, 2007).

Chez les mammifères il existe 3 homologues de Ph : PHC1/RAE28, PHC2 et PHC3. Tout comme Ph chez la drosophile peu de choses sont connues sur ces gènes si ce n'est leur capacité à interagir ensemble au sein du PRC1 dont ils assurent en partie la cohésion via le motif SAM présent sur leurs séquences (Gunster et al., 1997; Nomura et al., 1994; Tonkin et al., 2002).

Enfin, le gène polycomb possédant le plus d'homologues chez les mammifères est le gène Psc. Il existe en effet chez les mammifères 6 gènes possédant un motif RING finger (autre que RING1A/B), chacun pouvant être retrouvé au sein du PRC1 et appelés Polycomb group RING fingers (PCGFs) : PCGF1/NSPC1, PCGF2/Mel18, PCGF3, PCGF4/Bmi1, PCGF5 et PCGF6/MBLR. Les PCGFs ne peuvent se retrouver au sein d'un même complexe PRC1, elles sont mutuellement exclusives. Ainsi une étude récente a proposé de nommer les différents sous-complexes PRC1 en fonction du PCGF contenu (Gao et al., 2012) : PRC1.1 si NPSC1 est présent, PRC1.2 s'il s'agit de Mel18, et ainsi de suite jusqu'au PRC1.6 avec MBLR. Les différents PCGFs, n'interagissant pas avec les mêmes partenaires, vont conditionner la composition finale du complexe PRC1. Par exemple le PRC1.1 est le seul à contenir la protéine BCOR (Junco et al., 2013). En ce qui concerne les polycombs CBX et Phc, elles ne sont retrouvées que dans les complexes PRC1.2 et 1.4. Contrairement aux autres PRC1 on ne peut retrouver des histones déacétylases (HDAC) qu'au sein du PRC1.6 (Gao et al., 2012). Tous ces sous-complexes peuvent être présents dans une même cellule car ils interagissent avec des régions différentes du génome et vont donc inhiber des cibles différentes.

Le PhoRC chez *Drosophila melanogaster* :

Chez la drosophile il existe encore un troisième complexe appelé PhoRC. Ce complexe est constitué de deux sous-unités, Pho et Sfmt1 (Klymenko et al., 2006; Simon and Kingston, 2009). Pho est le seul polycomb à pouvoir se lier directement à l'ADN. Des séquences d'ADN appelées Polycomb Response Element (PREs) sont reconnues par PhoRC qui va à son tour recruter les PRC1 et 2 aux niveaux de leurs gènes cibles (Margueron and Reinberg, 2011). Plusieurs études ont tenté de retrouver un mécanisme similaire chez les mammifères. L'une d'elle a utilisé le ChIP sequencing avec des membres des PRC1 et 2 dans des cellules souches embryonnaires sans pouvoir détecter de motif de séquence spécifique équivalent aux PREs, si ce n'est que le PRC2 cible des séquences riches en îlots CpG (Ku et al., 2008). D'autres études ont identifié des PREs potentiels chez les mammifères mais situés sur des régions très spécifiques (entre les gènes *Hoxd11* et *Hoxd12*) et pas sur l'ensemble du génome (Woo et al., 2010). Ces études suggèrent un rôle important pour le facteur de transcription Yy1, l'homologue de Pho (Wang et al., 2004b), dans le recrutement des PRCs (Wilkinson et al., 2006; Xi et al., 2007). Néanmoins, Yy1 ne semble interagir qu'avec très peu de gènes cibles des polycombs (Xi et al., 2007); ce mode de recrutement semble donc loin d'être général chez les mammifères.

C. Le mode d'action des PcG

Les protéines polycombs sont des répresseurs transcriptionnels épigénétiques, qui en modifiant post-traductionnellement certains résidus des queues d'histones vont pouvoir empêcher la transcription de gènes spécifiques. Ces modifications, H3K27me3, H3K9me3 et H2AK119ub, vont moduler la conformation de la chromatine et l'accès à l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle. Les mécanismes moléculaires précis par lesquels les PcGs répriment la transcription chez les mammifères ne sont pas encore totalement compris et il semble en coexister plusieurs.

Le mode d'action canonique :

La découverte des PRCs chez la drosophile a fait émerger un modèle séquentiel de leur action (Figure 4). Tout d'abord le PhoRC reconnaît des séquences spécifiques d'ADN, les PREs, et va ainsi recruter le PRC2 auprès des régions chromosomiques contenant les gènes cibles. Le PRC2 dépose ensuite sa marque, principalement la tri-méthylation H3K27me3 (Cao et al., 2002; Muller et al., 2002). Cette marque est ensuite reconnue par les protéines à chromodomaine composant le PRC1 qui va s'y lier (Min et al., 2003), ce qui peut engendrer le rapprochement de nucléosomes voisins et ainsi permettre au PRC2 d'étendre sa marque (Schwartz et al., 2006). Le PRC1, via la protéine Ring, va être responsable de la mono-ubiquitination de l'histone H2AK119 qui est associée au blocage du recrutement de la machinerie transcriptionnelle ainsi qu'à une compaction de la chromatine (Cao et al., 2005; Dellino et al., 2004; Francis and Kingston, 2001; Wang et al., 2004a). Ce modèle a pendant longtemps été le seul connu chez les mammifères. Toutefois, la grande diversité présente au sein des PRCs a fait émerger plusieurs autres modèles et l'on considère désormais celui précédemment décrit comme canonique chez les mammifères.

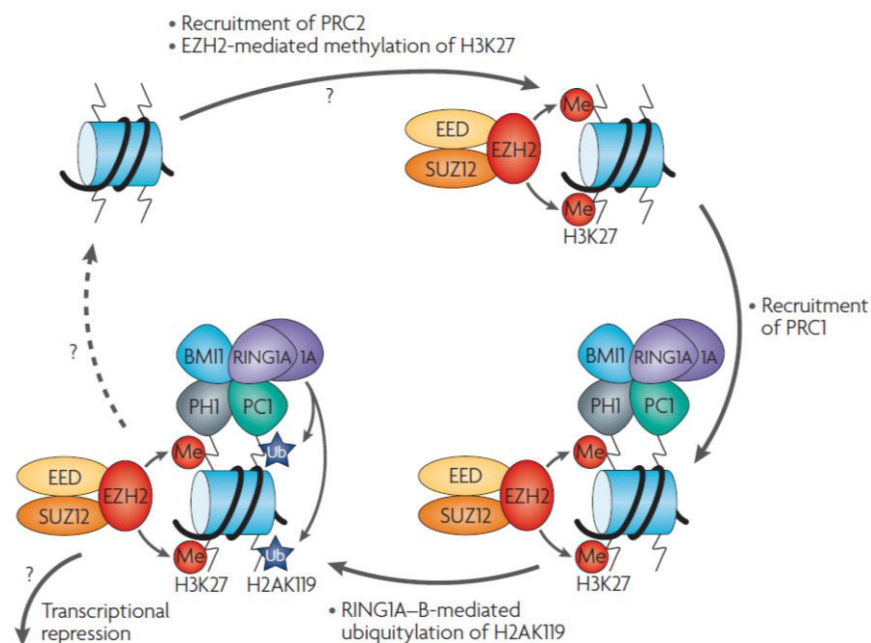


Figure 4. Mode d'action canonique des complexes PRCs. Dans le modèle canonique l'action des polycombs débute par le recrutement du PRC2 au niveau des nucléosomes contenant le gène cible. L'activité enzymatique d'EZH2 induit la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). Cette marque histone participe au recrutement du PRC1 dont l'enzyme RING1A mono-ubiquitine le résidu lysine en position 119 de l'histone H2A (H2AK119ub1). La présence des deux PRCs va induire la compaction de la chromatine ainsi que le blocage de l'élongation de l'ARN polymérase II conduisant à la répression transcriptionnelle des gènes cibles. Figure issue de Spivakov and Fisher, 2007.

Recrutement du PRC1 indépendamment du PRC2 :

Les protéines à chromodomaine nécessaires à la reconnaissance de la marque H3K27me3 déposée par le PRC2 ne se retrouvent que dans une fraction des sous-complexes PRC1. En effet, seul les complexes Mel18/PRC1.2 et Bmi1/PRC1.4 contiennent, bien que ce ne soit pas toujours le cas, les protéines Cbx capable d'interagir avec la marque du PRC2 (Gao et al., 2012). Les formes PRC1.2 et PRC1.4 lorsqu'elles sont liées aux Cbx, semblent être les seules à suivre le mode d'action canonique décrit pour la première fois chez la drosophile.

En plus de ces complexes, il existe des formes de PRC1.2 et PRC1.4 que l'on retrouve liées aux protéines RYBP ou Yaf2 plutôt qu'aux partenaires canoniques du PRC1 (Cbx et Phc) suggérant que ces protéines peuvent jouer un rôle dans des modes de recrutements indépendants du PRC2 (Gao et al., 2012). Cbx7, l'une des protéines à chromodomaine du PRC1, et RYBP se lient toutes deux au même domaine C-terminal de Ring1B ce qui soutient que ces protéines pourraient avoir un rôle de recrutement du PRC1 bien que le mode d'action soit différent (Wang et al., 2010a). Lorsqu'ils sont couplés à RYBP ou Yaf2 les complexes PRC1.2 et PRC1.4 sont retrouvés au niveau de régions chromosomiques ne présentant pas de marque H3K27me3.

Recrutement via les facteurs de transcriptions :

Le mode de recrutement du PRC1 auprès de ces cibles peut donc varier d'un sous-complexe à l'autre. Le PRC1.6 peut par exemple interagir avec E2F6 qui semble participer au recrutement du complexe au niveau des promoteurs de ses gènes cibles (Trojer et al., 2011). Le PRC1.1 lui est capable de se lier aux protéines BcorL1 et Bcl6 et de moduler leurs gènes cibles (Gearhart et al., 2006). Le recrutement des PRCs via des facteurs de transcription semble être un mode de recrutement important chez les mammifères puisqu'il a également été montré avec Gata1 (Ross et al., 2012), Hic1 (Boulay et al., 2012), Rest (Dietrich et al., 2012) et le complexe Runx1/CBF β (Yu et al., 2012). Dans la leucémie aigüe promyélocytaire la translocation des gènes *PML* ou *PLZF* avec le gène *RARA* conduit à la formation de facteurs de transcription oncogéniques (PML/RARA, PLZF/RARA) qui en interagissant respectivement avec le PRC2 et le PRC1 induisent un recrutement ectopique de ces complexes (Boukarabila et al., 2009; Villa et al., 2007).

Recrutement via les ARN non-codant (ARNnc) :

En plus de ce mode de recrutement pouvant s'appliquer aussi bien au PRC2 qu'au PRC1, un mécanisme supplémentaire impliquant des ARN non-codants (ARNnc) peut s'y ajouter. En effet, l'ARNnc ANRIL a été montré comme pouvant interagir avec le PRC1 (Yap et al., 2010) tandis que l'ARNnc Xist semble capable d'interagir avec Ezh2 lors de l'inactivation du chromosome X (Margueron and Reinberg, 2011).

Renversement dans la hiérarchie des PRCs :

De récentes études renversent totalement le modèle canonique du mode d'action des PRCs. En effet, dans ces études il apparaît que la marque H2AK119ub1 déposée par le PRC1 peut précéder le recrutement du PRC2 et serait même capable de l'induire. Une revue reprenant ces études propose un modèle alternatif où les PRC1 non canoniques (ne possédant pas de protéine CBX) ubiquitinent H2A ce qui a pour effet de recruter le PRC2 qui peut alors tri-métyler l'histone H3 assurant ainsi la répression transcriptionnelle (Comet and Helin, 2014). Ces études étant récentes il est difficile de savoir si ce mode de recrutement des PRCs est généralisable ou ne représente qu'une exception.

Autres activités enzymatiques associées aux PRCs :

Enfin, il existe des activités enzymatiques, autres que celles de Ring1A/B et Ezh1/2, associées aux PRCs et capables d'induire par elles-mêmes une répression transcriptionnelle. PCGF6/MBLR peut par exemple interagir avec plusieurs HDACs qui sont très souvent associées à une répression de la transcription (Gao et al., 2012). À la fois Ezh2 du PRC2 et Bmi1 du PRC1 interagissent avec des DNA méthyltransférase (DNMTs) comme DNMT1. Le recrutement de DNMT1 favorisant la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs de gènes cibles va contribuer à la répression transcriptionnelle (Negishi et al., 2007). Cbx4 quant à elle possède une activité E3 SUMO ligase et l'on retrouve parmi ses cibles plusieurs régulateurs transcriptionnels comme CtBP ainsi que DNMT3 (Li et al., 2007).

La grande variété de sous-complexe de PRCs et le grand nombre de protéines régulant la transcription auxquelles ils peuvent s'associer font des polycombs des acteurs majeurs de la régulation génique et de ce fait ils se retrouvent impliqués dans de nombreux processus cellulaires.

D. Rôles généraux des polycombs

Les mécanismes de régulation épigénétique sont fortement impliqués dans les processus développementaux et parmi eux les protéines polycombs ont un rôle majeur. Les 10 à 15 dernières années ont vu les études sur ces protéines se multiplier et ont permis de mieux entrevoir la fonction de cette famille de protéines (même si beaucoup reste à faire). En effet, au fil des études démontrant le grand nombre de gènes régulés par les polycombs ainsi que leur présence sur une grande partie de la chromatine, leur rôle est passé de simple régulateur transcriptionnel des gènes *Hox* à une fonction bien plus étendue de garant de l'identité cellulaire.

Le développement embryonnaire :

Dès leur découverte les protéines de la famille polycomb ont été associées à la régulation de facteurs de transcription cruciaux pour le développement de l'organisme tels que les gènes *Hox* (Lewis, 1978). La perte de fonction par invalidation de différents membres du PRC2 comme Suz12, Ezh2 ou Eed a pour conséquence de causer la mort de l'embryon dès les étapes précoces du développement (Faust et al., 1995; O'Carroll et al., 2001; Pasini et al., 2004). Le K.O de la sous-unité enzymatique du PRC1, Ring1B, est également létal durant l'embryogénèse suite à un défaut de gastrulation (de Napoles et al., 2004; Voncken et al., 2003). De même l'altération de l'expression de Bmi1 ou de Mel18, deux PCGF, bien que non létale provoque des défauts dans la formation de l'axe antéro-postérieur du squelette ainsi que des défauts de croissance (Akasaka et al., 1996; Alkema et al., 1995). La létalité précoce des souris K.O. pour la plupart des gènes polycombs a permis de mettre en évidence leur importance pour le développement embryonnaire sans pour autant identifier leurs rôles. L'étude de la fonction des polycombs au sein des cellules souches embryonnaires (CSE) et au

cours de leur différenciation a permis de mieux entrevoir le rôle de ces gènes dans les processus développementaux.

CSE et domaines Bivalents :

De façon surprenante, plusieurs études sur les CSE ont révélé que la marque H3K27me3, déposée par le PRC2, était fréquemment retrouvée auprès d'une autre triméthylation, H3K4me3, déposée par les protéines de la famille trithorax (SET1A/B et MLL1/2) et couramment associée aux promoteurs actifs (Azuara et al., 2006; Bernstein et al., 2006a). Ces régions de la chromatine possédant à la fois des marques activatrices et répressives de la transcription sont appelées domaines bivalents. On les retrouve sur un grand nombre de régions promotrices au sein des CSE et plus particulièrement au niveau de gènes codant pour des facteurs de transcription impliqués dans le développement et la différenciation ainsi que des morphogènes et des protéines de surfaces (Mikkelsen et al., 2007).

Les domaines bivalents maintiennent les promoteurs auxquels ils sont associés dans un état particulier, un état intermédiaire entre activation et répression. Une partie de la machinerie transcriptionnelle est en effet présente au niveau du promoteur, comme par exemple l'ARN polymérase II, mais sous une forme inactive. Les promoteurs sous domaine bivalent sont donc inactifs mais particulièrement réceptif aux signaux développementaux permettant ainsi une expression rapide des gènes lorsqu'elle est requise (Nishiyama et al., 2009; Sharov and Ko, 2007).

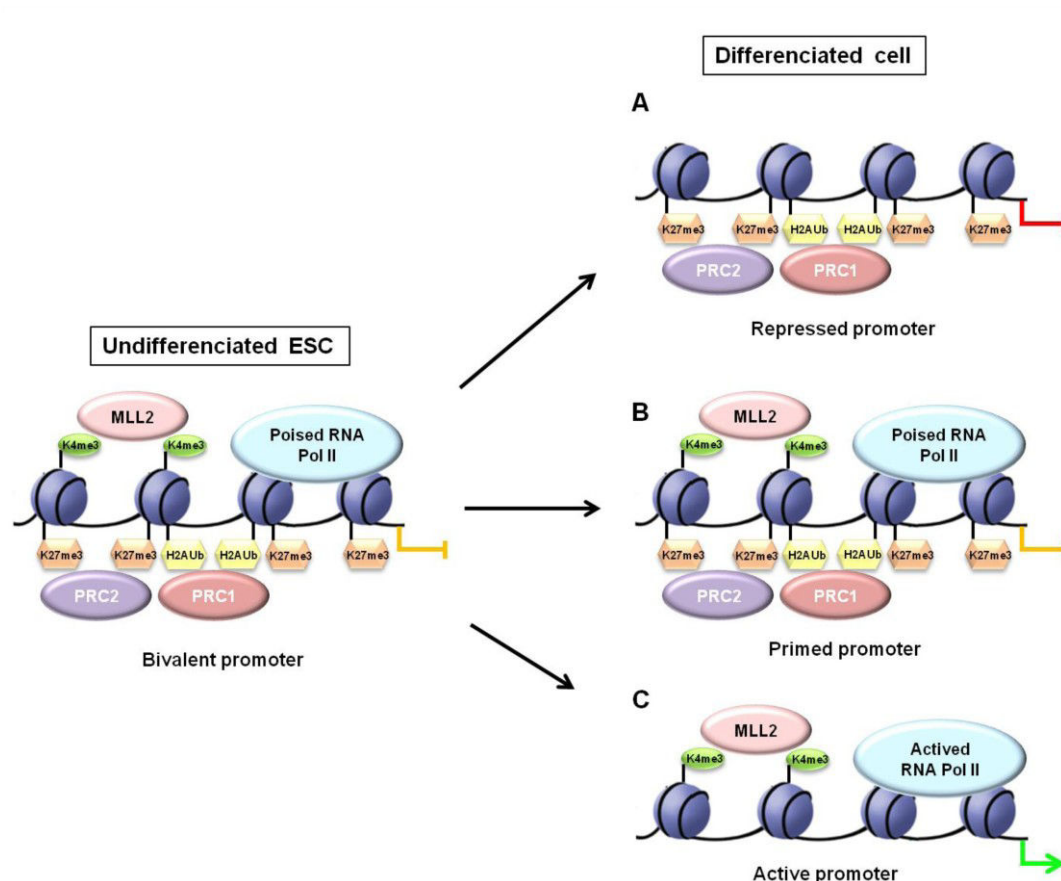


Figure 5. Résolution d'un domaine bivalent au cours de la différenciation. La partie gauche du schéma représente le promoteur d'une cellule souche embryonnaire, sous le contrôle d'un domaine bivalent. La marque activatrice H3K4me3 ainsi que les marques répressives H3K27me3 et H2A119ub1 sont présentes au niveau des histones de ce promoteur. Bien qu'une partie de la machinerie transcriptionnelle soit présente elle demeure inactive. La partie droite représente la résolution du domaine bivalent au cours de la différenciation. 3 cas possibles, **A** : le gène n'est pas utile pour la voie de différenciation dans laquelle la cellule est engagée. Les marques activatrices sont perdues au profit de marques répressives et le promoteur est inhibé. **B** : le gène n'est pas nécessaire mais pourrait l'être ; le domaine bivalent se maintient. **C** : l'activation du gène est nécessaire pour la cellule nouvellement différenciée. Le promoteur perd les marques répressives et recrute les facteurs nécessaires à sa transcription.

Au cours de la différenciation des cellules ES, les domaines bivalents vont se maintenir ou perdre l'une de leurs deux marques selon la nécessité de l'expression du gène concerné pour le lignage vers lequel la cellule doit s'orienter (Voigt et al., 2013 pour revue). La Figure 5 représente une version simplifiée de la résolution d'un domaine bivalent au cours de la différenciation d'une cellule souche vers un lignage bien spécifique :

- **Cas A** : L'activation du gène est inappropriée pour la voie de différenciation dans laquelle est engagée la cellule (généralement des gènes propres à d'autres voies de

différenciation). Ce gène perd la marque activatrice H3K4me3. La perte de cette marque se traduit en général par un renforcement de la présence d'agents répresseurs comme le recrutement de DNMTs, l'extension de la marque H2AK119ub1 déposée par le PRC1 ainsi que la marque répressive H3K9me3 qui peut être déposée par les enzymes SUV39H1 ou ESET/SETDB1. La chromatine est dans un état condensé et les promoteurs de ces gènes sont alors complètement inhibés

- **Cas B :** L'activation du gène n'est pas nécessaire pour la cellule mais pourrait l'être plus tard. Les gènes dans ce cas peuvent être importants pour des processus ponctuels ou coder pour des protéines caractéristiques d'un état de différenciation plus avancé dans le même lignage. Les domaines bivalents présents sur ces gènes restent stables et les promoteurs demeurent dans un état inactif bien qu'une partie de la machinerie transcriptionnelle soit présente.
- **Cas C :** L'activation du gène est nécessaire à la cellule nouvellement différenciée. Les promoteurs perdent alors les marques inactivatrices déposées par les polycombs (H3K27me3 et H2AK119ub1). Les facteurs nécessaires à l'activation de la machinerie transcriptionnelle sont recrutés au niveau du promoteur qui devient alors actif.

De plus, au cours de la différenciation, de nouveaux domaines bivalents peuvent apparaître selon les gènes potentiellement nécessaires aux cellules progénitrices ou nouvellement différenciées (Mohn et al., 2008).

Les cellules souches adultes :

Les protéines polycombs sont également essentielles au maintien de l'homéostasie de nombreux tissus de par leur rôle essentiel au maintien des cellules souches adultes ainsi qu'à leur différenciation. La perte de fonction du PRC2 via la délétion d'Ezh1/2 perturbe le processus d'auto-renouvellement permettant le maintien des cellules souches de la peau et déclenche une différenciation aberrante de ces cellules vers un seul type cellulaire (Bardot et al., 2013; Ezhkova et al., 2009). La protéine polycomb CBX4 assure également le maintien de ces cellules souches en les conservant dans un état de quiescence (Luis et al., 2011). Les cellules souches intestinales requièrent également la présence d'un PRC2 fonctionnel comme

le montre la délétion de *Suz12* qui à elle seule peut initier le programme de différenciation en entérocytes (Benoit et al., 2012). De la même façon, les PRC1 et 2 sont essentiels à l'homéostasie du tissu neuronal (Molofsky et al., 2003; Pereira et al., 2010) ainsi que du compartiment hématopoïétique (Kamminga et al., 2006; Park et al., 2003).

La capacité des polycombs à modeler l'identité cellulaire en apposant leurs marques histones a conduit plusieurs études à s'intéresser à cette empreinte afin de pouvoir la modifier et transformer des cellules d'un type vers un autre (Davis and Eddy, 2013). En effet, la transdifférenciation (transformer une cellule différenciée en un autre type de cellule différenciée) est une étape-clé de la médecine régénérative, une stratégie thérapeutique encore en cours de développement visant à remplacer les cellules défaillantes d'un organe ou d'un tissu malade par des cellules nouvellement transdifférenciées. La transdifférenciation permet en effet de s'affranchir de la difficulté à trouver un donneur compatible et de la possibilité d'un rejet du greffon par l'organisme puisque l'on réalise une auto-greffe (une greffe avec des cellules du receveur).

Inactivation du chromosome X et empreinte parentale :

Les protéines polycombs sont également des verrous transcriptionnels impliqués dans plusieurs processus requérant une répression stable et transmissible de la transcription de gènes cibles. Les polycombs sont par exemple nécessaires à l'inactivation du chromosome X permettant la répression de l'un des deux chromosomes X chez les femelles mammifères. Cette inactivation est nécessaire afin que les niveaux protéiques des gènes présents sur les chromosomes X femelles ne soit pas deux fois plus élevés que chez un mâle ne possédant qu'un seul chromosome X et donc moitié moins d'allèles de ces gènes. La perte de fonction du PRC1 par délétion de *RING1A* et *RING1B* ou du PRC2 via *EED* dans des CSE femelles conduit en effet à la perte de l'inactivation du chromosome X chez la souris (de Napoléon et al., 2004). Les gènes présents sur les 2 chromosomes X de ces cellules sont alors actifs conduisant à un doublement du niveau protéique des peptides codés par ces gènes. De la même façon les polycombs sont requis pour le maintien de l'empreinte parentale permettant l'expression mono-allélique de gènes qui eux aussi seraient délétères pour la cellule sans cela. L'ARN non codant *Kcnq1ot1* permet par exemple le recrutement indépendant du PRC1 et du PRC2 au niveau des clusters *Kcnq1* et *Igf2* permettant ainsi la répression des gènes les composant soumis à l'empreinte parentale.

E. Polycombs et cancer

La capacité des complexes polycombs à réprimer de nombreux gènes impliqués dans les processus anti-tumoraux (arrêt du cycle cellulaire, apoptose, sénescence..) fait que l'on retrouve une altération de l'expression ou de la fonction de ces protéines dans la plupart des types de cancers (Table 1). Toutefois, certains polycombs, comme par exemple PCGF2/MEL18, semblent au contraire avoir majoritairement un effet suppresseur de tumeur (Tetsu et al., 1998).

PRC2	Aberrant expression	Cancer type
Ezh2	Ovrexpression and/or amplification	B cell non-Hodgkin lymphomas, bladder cancers, breast cancers, colon cancers, glioblastoma, Hodgkin lymphomas, oral cancers, liver cancers, lung cancers, lymphoma, mantle cell lymphomas, melanomas, prostate cancers, testicular cancers.
SUZ12	Ovrexpression and/or amplification	Breast cancers, colon cancers, germinal cell-derived tumors, liver cancers, lung cancers, mantle cell lymphomas, melanomas, parathyroid and pituitary adenomas.
Pcl3/Phf19	Ovrexpression	Colon cancers, skin cancers, lung cancers, rectal cancers, cervical cancers, uterus cancers, liver cancers.

PRC1		
CBX7	Ovrexpression	Follicular lymphoma.
	Loss	Pancreatic cancers.
PCGF4/BMI1	Ovrexpression and/or amplification	Acute myeloid leukemias, breast cancers, gastrointestinal tumors, lymphomas, medulloblastomas, neuroblastomas, lung cancers, parathyroid and pituitary adenomas.
PCGF2/MEL18	Loss	Cutaneous squamous-cell carcinomas, gynecological tumors, prostate cancers.
RING1A	Loss	Clear-cell renal-cell carcinomas, testicular germ-cell tumors.
RING1B	Ovrexpression	Bladder cancers, breast cancers, colon tumors, gynecological tumors, kidney cancers, larynx cancers, liver cancers, lung cancers, lymphomas, melanomas, pancreas cancers, parathyroid and thyroid cancers, prostate cancers, skin cancers, thymus cancers, urinary tract cancers.

Table 1. Expression des polycombs dans les pathologies néoplasiques. Ce tableau recense les types de cancers présentant une expression aberrante de gènes appartenant à la famille des polycombs. Les surexpressions, les amplifications et pertes géniques sont indiquées pour les principaux polycombs. Tableau adapté de Sauvageau and Sauvageau, 2010.

Le cycle cellulaire :

Plusieurs gènes impliqués dans l'inhibition du cycle cellulaire, notamment les inhibiteurs de kinase cycline-dépendante (Cdk), sont retrouvés réprimés par les complexes polycombs dans de nombreux types cellulaires. En effet, BMI1, RING1B, EZH2 ou encore SUZ12 participent à la répression du locus *CDKN2A*, comprenant les gènes *p16^{INK4A}* et *p14^{ARF}* (*p19^{ARF}* chez la souris), locus impliqué dans l'inhibition du complexe Cyclin D-CDK4/6

responsable de la progression du cycle cellulaire à travers la phase G1 (Gil and Peters, 2006; Maertens et al., 2009). Le locus *CDKN2A* joue également un rôle dans la mise en place de la sénescence à travers la régulation de la protéine pRB. EZH2 via le PRC2 est également capable de réprimer un autre inhibiteur de Cdk : *p15^{INK4B}* (Kheradmand Kia et al., 2009).

L'apoptose :

Les voies apoptotiques sont elles aussi inhibées dans les cellules cancéreuses en grande partie via la répression par les polycombs de gènes pro-apoptotiques. L'absence de BMI1 induit une augmentation de l'apoptose dans les cellules tandis que sa surexpression les protège et assure leur survie (Lee et al., 2008). BMI1 inhibe l'apoptose à travers la répression du gène pro-apoptotique *NOXA* dans les cellules lymphoïdes (Yamashita et al., 2008). *BIM*, un autre membre pro-apoptotique, peut être réprimé par BMI1 et EZH2 respectivement dans le myélome multiple et dans des cellules de carcinomes de poumon et d'ostéosarcomes (Jagani et al., 2010; Wu et al., 2010).

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) :

Les protéines polycombs participe également à la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui est un processus développemental impliqué dans l'invasion tumorale et la formation de métastases. Twist1, un acteur majeur de l'EMT, est responsable de la sur-expression de BMI1 dans le cancer de la tête et du cou. Ces deux protéines coopèrent ensuite dans la répression de l'E-cadhérine, une protéine membranaire responsable de la liaison entre les cellules et considérée comme un gène suppresseur de tumeur, et induisent ainsi l'EMT de ces cellules (Yang et al., 2010). EZH2 a également été décrit comme un répresseur de l'E-cadhérine dans les cancers de la prostate (Cao et al., 2008).

Les protéines polycombs interviennent dès les phases précoces de la tumorigénèse en permettant aux cellules cancéreuses d'échapper aux voies de morts cellulaires. Elles soutiennent également la prolifération tumorale en régulant plusieurs gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Enfin, en stimulant la transition épithélio-mésenchymateuse les polycombs augmentent les propriétés migratoires et invasives des cellules cancéreuses ouvrant ainsi la

voie au développement de métastases. La protéine polycomb BMI1 est directement impliquée dans l'ensemble de ces processus.

III. Bmi1

A. Le gène *Bmi1*

Le gène *Bmi1* (ou *Pcgf4*) (B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site) a été pour la première fois identifié comme un oncogène pouvant collaborer avec c-MYC dans la lymphomagenèse dans un modèle de souris transgéniques (Haupt et al., 1991; van Lohuizen et al., 1991). *BMI1* est le premier gène appartenant à la famille des polycombs à être caractérisé chez les mammifères, il appartient plus particulièrement au groupe des PCGF qui sont des homologues de *Psc* chez la drosophile (Alkema et al., 1997).

Ce gène localisé sur le chromosome 10 (10p13) code pour une protéine de 326 acides aminés d'environ 37kDa chez l'humain et 35kDa chez la souris avec qui elle partage environ 86% d'homologie de séquence. Le domaine Ring finger se trouve en N-terminal de la protéine qui possède également un domaine central Helix-Turn-Helix généralement impliqué dans les interactions protéine-ADN bien qu'aucune étude n'a pu démontrer une telle liaison (Figure 6). BMI1 possède également deux motifs d'adressage au noyau appelés Nuclear Localization Signal (NLS) ainsi qu'un domaine PEST-like (proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T) riche) en C-terminal qui est impliqué dans la stabilité de la protéine (Yadav et al., 2010). En effet, lorsque ce motif est muté le temps de demi-vie de la protéine BMI1 passe d'environ 25 minutes à 2 heures ; ce motif est donc essentiel pour une régulation rapide de BMI1 via sa dégradation par le protéasome.



Figure 6. Représentation du gène *BMI1* humain. Plusieurs domaines sont présents sur le gène *BMI1*. Le domaine Ring Finger (18-56pb), le domaine Helix-Turn-Helix (168-222pb) et le domaine PEST-Like (250-326pb). Le gène comporte également deux séquences permettant l'adressage au noyau de la protéine : NLS1 et NLS2 pour Nuclear Localization Signal. Figure adaptée de Yadav et al., 2010.

BMI1 fait partie du complexe PRC1 dans sa version canonique ou non. Cette protéine ne possède aucune activité enzymatique mais son rôle au sein du complexe semble être de stimuler l'activité E3 ubiquitine ligase de RING1A/B permettant la création de la marque répressive H2AK119ub (Buchwald et al., 2006; Cao et al., 2005). *BMI1* est souvent opposée à une autre protéine polycomb, MEL18/PCGF2. En effet, on retrouve une forte expression de *BMI1* dans les cellules souches adultes et une diminution de celle-ci au cours de la différenciation contrairement à MEL18 qui est plutôt exprimé dans les cellules plus matures. C'est le cas au cours de l'hématopoïèse où l'on observe une forte expression de *BMI1* dans les cellules CD34⁺, un marqueur membranaire associé aux CSH, et sa diminution au profit de MEL18 dans les cellules présentant des marqueurs liés à la différenciation (Akashi et al., 2003; Lessard et al., 1998). De plus, MEL18 semble être capable de réprimer l'expression de *BMI1*, une fonction importante pour son rôle suppresseur de tumeur (Guo et al., 2007).

Peu de choses sont connues sur la régulation post-traductionnelle de *BMI1*. Son ubiquitination par la protéine β TrCP permet de réguler sa dégradation par le protéasome (Sahasrabuddhe et al., 2011) tandis que sa sumoylation par le polycomb CBX4 semble être essentielle à son recrutement au niveau des sites présentant des dommages à l'ADN (Ismail et al., 2012). De plus, *BMI1* peut être phosphorylée sur résidus sérine par la protéine AKT ce qui permet une stabilisation du polycomb nécessaire à son rôle dans la machinerie de réparation des dommages à l'ADN ainsi qu'à celui de stimulateur de l'activité E3 ubiquitine ligase de son partenaire RING1 (Liu et al., 2012; Nacerddine et al., 2012). À l'inverse, la voie p38MAPK/p3K est responsable d'une phosphorylation de *BMI1* qui induit sa dissociation de la chromatine et sa sortie du noyau inhibant ainsi sa fonction (Kim et al., 2011; Voncken et al., 2005).

B. Souris *Bmi1*^{-/-}

Contrairement aux délétions d'autres protéines polycombs, comme EZH2 ou RING1B, la délétion de BMI1 chez la souris n'est pas létale au niveau embryonnaire. À la naissance, les souris *Bmi1*^{-/-} présentent un phénotype proche des souris sauvages mais elles développent très rapidement une série de défauts qui conduisent à une mort prématurée entre 3 et 20 semaines après la naissance. Dès les premières semaines de leurs vies les souris K.O. pour *Bmi1* vont développer des défauts neurologiques comme des crises sporadiques proches de l'épilepsie ainsi qu'une ataxie se traduisant par des troubles de la coordination des mouvements volontaires (van der Lugt et al., 1994). Ces troubles sont liés à une hypoplasie du cervelet, centre du contrôle moteur, notamment une réduction du nombre de cellules de Purkinje. Les souris *Bmi1*^{-/-} présentent également un retard de croissance et des défauts dans la structure de la colonne vertébrale que l'on retrouve également dans plusieurs modèles murins de perte ou gain de fonction de gènes homéotiques *Hox* (Deschamps and Meijlink, 1992; McGinnis and Krumlauf, 1992). On observe également chez ces souris une diminution progressive du nombre de cellules souches hématopoïétique (CSH) dans la moelle osseuse avec à l'inverse une augmentation de la population adipocytaire. Cette perte de CSH a pour conséquence une hypoplasie du thymus et de la rate qui conduit à une augmentation du nombre d'infections chez ces souris (van der Lugt et al., 1994).

La transplantation de cellules de foie fœtal ou de moelle osseuse de souris *Bmi1*^{-/-} dans une souris préalablement irradiée ne permet qu'une reconstitution transitoire du système hématopoïétique. Ce phénotype s'explique par une augmentation de l'apoptose dans les organes lymphoïdes ainsi que par une perte de la capacité d'auto-renouvellement permettant le maintien à long terme des CSH (Jacobs et al., 1999b). La délétion de *Bmi1* conduit à l'expression des gènes *p16*^{INK4A} et *p19*^{ARF}, appartenant tous deux au locus *CDKN2A*, dans les CSH et les CSN qui conduisent respectivement à un arrêt de la prolifération et à une mort cellulaire p53-dépendante. La délétion du locus *CDKN2A* chez des souris *Bmi1*^{-/-} permet une restauration importante du phénotype observé chez les souris *Bmi1*^{-/-}, les hypoplasies du cervelet, du thymus et de la rate étant en grande partie corrigées. Cela n'est toutefois pas suffisant pour améliorer la viabilité de ces souris (Bruggeman et al., 2005).

C. Bmi1 et cellules souches

L'homéostasie des tissus dépend du renouvellement des différents types cellulaires qui le composent. Cette fonction est assurée par les cellules souches adultes que l'on retrouve dans la quasi-totalité des tissus (cellules souches neuronales, intestinales, hématopoïétiques, intestinales, de peau...). Ces cellules sont principalement caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement, permettant leur maintien sur le très long terme, et la propriété de multipotence qui leur permet de pouvoir se différencier en tous les types cellulaires composant le tissu auquel elles appartiennent. BMI1 est essentielle au maintien de ces deux caractéristiques et fait partie des facteurs associés aux cellules souches dont les plus connus sont NANOG, SOX2 et OCT4. BMI1 participe au maintien de la multipotence de ces cellules en empêchant l'expression des gènes permettant leur différenciation. Comme la plupart des autres polycombs BMI1 intervient dans la mise en place des domaines bivalents au niveau des promoteurs des gènes permettant la différenciation. Dans les CSH, la perte de BMI1 se traduit par la perte des marques répressives au niveau des domaines bivalents présents sur les promoteurs des gènes *EBF1* et *PAX5*, deux gènes impliqués dans la différenciation des CSH vers le lignage des lymphocytes B. Seule la marque activatrice demeure sur ces gènes ce qui conduit à leur expression et à l'orientation des cellules vers le lignage des lymphocytes B (Oguro et al., 2010).

BMI1 et auto-renouvellement :

L'importance de BMI1 pour l'auto-renouvellement a tout d'abord été mis en évidence par sa délétion dans les cellules souches hématopoïétiques (Park et al., 2003) avant que son rôle soit généralisé au sein de la plupart des cellules souches adultes (neuronales, bronchio-alvéolaires, de prostate...) (Dovey et al., 2008; Lukacs et al., 2010; Molofsky et al., 2005). Ce rôle de BMI1 dans le maintien de l'auto-renouvellement a ensuite été confirmé par sa surexpression dans les cellules souches neuronales ou hématopoïétiques qui a pour effet d'augmenter leur durée de vie ainsi que leur capacité à participer à l'organisation des tissus d'un second voire d'un troisième hôte après transplantations (Iwama et al., 2004; Lessard and Sauvageau, 2003; Wang et al., 2010b).

BMI1 et le locus *CDKN2A* :

BMI1 assure le maintien des cellules souches tout au long de la vie de l'organisme en réprimant plusieurs voies d'élimination de ces cellules et est impliqué dans la résistance à plusieurs types de stress. La répression du locus *CDKN2A* par BMI1 permet le blocage de l'expression de *p16^{INK4A}* et *p14^{ARF}*, deux inhibiteurs de kinase cycline-dépendante, dont l'expression peut conduire à la sénescence (un arrêt du cycle cellulaire « jugé » irréversible) ou l'apoptose.

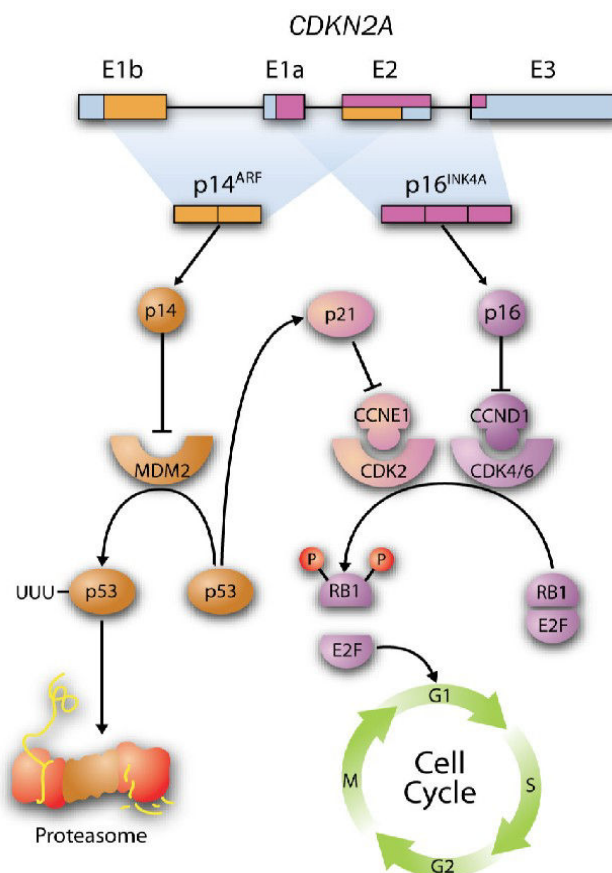


Figure 7. Le locus *CDKN2A* régule les suppresseurs de tumeurs p53 et RB1. Le locus *CDKN2A*, régulé par BMI1, code pour deux protéines : *p14^{ARF}* et *p16^{INK4A}*. Lorsqu'il est transcrit, *p14^{ARF}* inhibe l'ubiquitine ligase MDM2 empêchant ainsi la poly-ubiquitination et la dégradation de p53. La stabilisation de p53 a pour effet d'inhiber la Cyclin-dépendente kinase 2 (CDK2) via l'activation de p21. La protéine *p16^{INK4A}* va quant à elle inhiber CDK4/6 qui tout comme CDK2 participe à la phosphorylation de RB1. RB1 non-phosphorylé interagit avec E2F et le séquestre ; empêchant ainsi ce facteur de transcription de participer à la progression du cycle cellulaire. Figure issue de Sekulic et al., 2008.

p16^{INK4A}, lorsqu'il est exprimé, empêche la cycline D1 d'activer CDK4 et CDK6 qui sont responsables de la phosphorylation de la protéine RB1 qui peut alors séquestrer la protéine E2F (Figure 7). Ce facteur de transcription, normalement responsable de la progression du cycle de la phase G1 vers la phase S, ne peut plus assurer sa fonction ce qui se traduit par un blocage du cycle cellulaire conduisant à la sénescence. *p14^{ARF}* quant à lui est capable d'inhiber l'ubiquitine ligase MDM2 qui normalement régule p53 en l'orientant vers le protéasome pour sa dégradation. La stabilisation de p53 par *p14^{ARF}* permet l'induction de *p21^{WAF1/CIP1}* un autre inhibiteur de CDK qui conduit à un arrêt du cycle cellulaire ainsi que

l'activation de protéines pro-apoptotiques telles que BAD et BAX conduisant à la mort de la cellule.

BMI1 en réprimant le locus *CDKN2A* protège les cellules souches de l'apoptose et de la sénescence. La délétion de BMI1 dans des fibroblastes embryonnaires murins primaires (MEFs) conduit à une sénescence précoce de ces cellules en seulement 3 passages lorsqu'elles sont mises en culture associées à une augmentation de l'expression de *p16^{INK4A}* et de *p19^{ARF}* (homologue murin de *p14^{ARF}*). Lorsque ces cellules sont issues de souris *Bmi1^{-/-} CDKN2A^{-/-}* elles n'entrent en sénescence qu'après une dizaine de passages ; ce double K.O. permet ainsi la restauration du système hématopoïétique qui était déficient chez les souris *Bmi1^{-/-}* (Jacobs et al., 1999a).

BMI1 et sénescence répliative :

Il existe deux types de sénescence, la sénescence stress dépendante qui est le plus fréquemment induite par la réexpression du locus *CDKN2A* et la sénescence répliative qui elle est due à un raccourcissement des télomères. Les télomères sont des séquences d'ADN se trouvant à l'extrémité des chromosomes et dont les derniers nucléotides ne peuvent être copiés par la machinerie en charge de la réplication de l'ADN lors de la division cellulaire. Plusieurs études ont montré que la télomérase reverse transcriptase humaine (hTERT), dont l'activité ralentit le raccourcissement des télomères, pouvait être induite par l'expression de BMI1 dans certain types cellulaires (cellule de prostate, d'épithélium mammaire ou encore naso-pharyngal) ce qui a pour effet de bloquer la sénescence dite répliative (Song et al., 2006). Il est à noter que d'autres études suggèrent que la réexpression de l'enzyme hTERT dans des cellules urothéliales ou encore dans des kératinocytes a pour effet d'immortaliser ces cellules via l'induction de BMI1 suggérant que hTERT peut réguler l'expression de BMI1 (Qiao et al., 2013).

BMI1 et stress oxydatif :

BMI1 protège les cellules de l'apoptose et de la sénescence mais intervient également dans les protections mises en place face aux stress pouvant les induire. La perte de BMI1 par ARN interférence dans des cellules souches de cordon ombilical ou encore dans les cellules hématopoïétiques ou neuronales de souris *Bmi1*^{-/-} conduit à une altération des fonctions mitochondriales et à une augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive Oxygen Species (ROS) en Anglais) (Liu et al., 2009; Rizo et al., 2009).

Les ROS induisent des dommages au niveau de l'ADN qui lorsqu'ils sont trop importants orientent les cellules vers la sénescence ou l'apoptose. C'est par exemple le cas dans la moelle osseuse ou le cervelet des souris *Bmi1*^{-/-} (van der Lugt et al., 1994). À l'inverse la surexpression de BMI1 dans le compartiment hématopoïétique et notamment dans les CSH conduit ces cellules à une meilleure résistance au stress oxydatif (Nakamura et al., 2012). De la même façon le traitement des souris *Bmi1*^{-/-} avec un antioxydant tel que la N-acétylcystéine (NAC) réduit le niveau de ROS intracellulaires et protège les CSH ainsi que les CSN de la sénescence et de l'apoptose (Liu et al., 2009). On observe également cette augmentation de la concentration en ROS avec la perte progressive de l'expression de BMI1 au cours du vieillissement des neurones chez la souris ainsi que chez l'humain les conduisant à la sénescence et l'apoptose (Abdouh et al., 2012). BMI1 régule le niveau intracellulaire de ROS en empêchant le facteur de transcription p53 de réprimer plusieurs gènes impliqués dans la défense antioxydante (*Nrf1*, *GST1-α*, *Aldh6a1* et *Sestrin1*) (Chatoos et al., 2009).

BMI1 et dommages ADN :

BMI1 est également impliqué dans la machinerie en charge de la réparation des dommages à l'ADN induit ou non par les ROS. On retrouve BMI1 ainsi que plusieurs autres membres de la famille des polycombs (EZH1/2, RING1A/B, PHC1/2, MEL18) au niveau de sites de lésions de l'ADN induit par irradiation (Chou et al., 2010). Plusieurs études ont montré que BMI1 couplé à RING1B était recruté au niveau des foci de dommages à l'ADN par la machinerie de réparation de l'ADN et qu'il contribue à la mono-ubiquitination de H2AX. H2AX est une histone qui est phosphorylée en cas de lésions sévères de l'ADN (on l'appelle alors γH2AX), ce qui permet le recrutement de MDC1 et d'ATM, des acteurs majeurs de la réparation de l'ADN. La perte de BMI1 dans des cellules d'ostéosarcome

résulte en une diminution de la mono-ubiquitination de H2AX, une perte de sa phosphorylation induisant une altération du recrutement de MDC1 et ATM ce qui conduit à des défauts de réparations des dommages à l'ADN (Pan et al., 2011). Le recrutement de BMI1 au niveau des lésions de l'ADN est également vu comme un moyen de bloquer l'élongation transcriptionnelle de ces zones de la chromatine en attendant qu'elles soient réparées (Chagraoui et al., 2011).

D. Bmi1 et cancer

Parmi les protéines de la famille polycomb, EZH2 et BMI1 sont celles qui sont le plus fréquemment associées aux pathologies néoplasiques. *BMI1*, comme son nom complet l'indique, a initialement été découvert dans une étude cherchant à identifier les gènes impliqués dans l'oncogénèse induite dans un modèle E μ -Myc murin. BMI1 a depuis été retrouvé surexprimé dans de nombreux types de cancer (voir [Table 1](#)). BMI1 joue également un rôle important dans la transformation oncogénique comme c'est le cas lors de la transformation de lymphocytes B induite par la surexpression de l'oncogène Myc (van Lohuizen et al., 1991). BMI1 seul ne semble pas capable d'induire de néoplasme, en revanche il est indispensable à la transformation induite par d'autres oncogènes. C'est le cas pour la transformation oncogénique de cellules épithéliales mammaires via l'expression d'une forme constitutive active de RAS (RASG12V) ou encore de la transformation de CSH avec l'expression de RUNX1/AML1 ainsi que la transformation de cellules souches de cordon avec BCR-ABL (Datta et al., 2007; Harada et al., 2013; Hoenerhoff et al., 2009; Rizo et al., 2010) La surexpression de BMI1 est également nécessaire à l'immortalisation de certain types cellulaires (peau, poumon, glande mammaire) en plus de hTERT (Haga et al., 2007).

Régulation de l'expression de BMI1 :

Dans la plupart des cancers, la surexpression de BMI1 n'est que très rarement induite par une amplification génique (Bea et al., 2001; Hayry et al., 2008). Le plus souvent cette surexpression de BMI1 est due à l'action d'un oncogène comme le facteur de transcription SALL4 qui dans les leucémies est capable d'activer directement le promoteur de *BMI1* ainsi que d'autres facteurs de transcription essentiels au maintien des cellules souches comme

NANOG et *OCT4* (Yang et al., 2007). *NANOG*, *MYC*, *SP1* et *E2F1* sont également capables d'induire la surexpression de *BMI1* respectivement dans les cellules épithéliales de cancers de la tête et du cou, les neuroblastomes primaires et dans les carcinomes du nasopharynx (Nowak et al., 2006; Wang et al., 2013; Xie et al., 2014). On retrouve également dans ces cancers la répression de plusieurs micro-RNA tels que miR-128, miR-141 ou encore miR-200 qui sont normalement capables de d'inhiber la traduction de l'ARNm de *BMI1* (Dimri et al., 2013; Godlewski et al., 2008). Les possibilités de régulation de l'expression de *BMI1* apparaissent ainsi multiples et certaines cascades de régulation commencent à être identifiées ; ainsi, la protéine *ZEB1* surexprimée dans de nombreux cancers réprime miR-200 ce qui conduit à une surexpression de *BMI1* (Liu et al., 2014).

Tout comme pour les cellules souches adultes *BMI1* est impliqué dans de nombreux processus permettant le maintien dans le temps des cellules cancéreuses. L'action oncogénique principale de *BMI1* passe par la répression du locus *CDKN2A* qui a pour effet de permettre aux cellules d'échapper à l'apoptose et à la sénescence via les voies $p16^{\text{INK4A}}/\text{RB1}$ et $p14^{\text{ARF}}/p53$. Comme vu précédemment *BMI1* est impliqué dans la réponse au stress oxydatif et aux dommages à l'ADN qui sont deux voies ciblées par les thérapies anti-cancéreuses. Ainsi la surexpression de *BMI1* joue un rôle important dans la radio- et la chimio-résistance en régulant le niveau de ROS intracellulaires et en stimulant la machinerie de réparation des dommages à l'ADN pouvant être induits par les traitements mis en place (Dong et al., 2014; Gieni et al., 2011; Yin et al., 2011). C'est par exemple le cas dans le glioblastome, une tumeur agressive du cerveau, qui résiste à la radiothérapie, et aux lésions de l'ADN qu'elle cause, grâce à la surexpression de *BMI1* qui stimule la machinerie de réparation de l'ADN via son interaction avec *ATM*, *H2AX* et *PARP1*. La répression de l'expression de *BMI1* dans un tel contexte conduit à la sensibilisation des cellules de glioblastomes aux radiations (Facchino et al., 2010).

[BMI1 et EMT :](#)

BMI1 est également très impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse un processus au cours duquel une cellule va perdre ces propriétés épithéliales comme l'expression de protéines permettant l'adhérence entre cellules (E-cadhérine...) au profit de capacités migratoires et invasives (Martin and Cano, 2010; Xu et al., 2012). Ce processus permet également à ces cellules d'acquérir des caractéristiques proches des cellules souches

telles que l'auto-renouvellement ou encore à la capacité à former des métastases. Récemment plusieurs études ont relié BMI1 à l'EMT via la protéine TWIST1, un acteur majeur de l'EMT. TWIST1 est en effet responsable de la surexpression de BMI1 chez certains patients atteint de cancer de la tête et du cou. Les deux facteurs de transcription sont alors capable de coopérer dans la répression de l'E-cadhérine et de permettre ainsi la transition épithélio-mésenchymateuse conférant alors à la cellule la capacité d'initier de nouvelles tumeurs sous forme de métastases (Yang et al., 2010).

Activités de BMI1/RING1B indépendantes de la marque H2AK119ub1 :

La très grande majorité des études traitant du mode d'action de BMI1 sont focalisées sur son rôle de répresseur transcriptionnel, au sein du PRC1, à travers l'ubiquitination de l'histone H2A. Il existe toutefois d'autres protéines pouvant être ubiquitinées par le complexe RING1B/BMI1. Parmi elles, on retrouve plusieurs protéines jouant un rôle dans les pathologies cancéreuses :

- TP53, l'un des plus importants gènes suppresseurs de tumeur, peut être directement poly-ubiquitinée par le complexe RING1B/BMI1 dirigeant la protéine vers le protéasome assurant ainsi sa dégradation. Ce processus a pu être mis en évidence dans des modèles de neuroblastome, médulloblastome et leucémie aiguë lymphoblastique (Calao et al., 2013) ainsi que dans des tumeurs germinales malignes (Su et al., 2013).
- Geminin est un inhibiteur de la protéine CDT1 qui permet la réplication de l'ADN. La poly-ubiquitination de Geminin par RING1B/BMI1 conduit à sa dégradation et est impliquée dans le rôle oncogénique de BMI1 dans les cellules de cancer du sein (Qian et al., 2010).
- TOP2 (topoisomérase de type 2) est une protéine capable de se lier à l'ADN et d'induire une cassure double brin quand celui-ci est « entortillé ». Cette cassure double brin est ensuite réparée une fois la molécule d'ADN démêlée. L'étoposide, un agent chimiothérapeutique utilisé dans de nombreux cancers, est capable de stabiliser le complexe TOP2/ADN ce qui a pour effet de multiplier les dommages à l'ADN tout en empêchant leur réparation. La dégradation de TOP2 via la poly-ubiquitination induite par BMI1 diminue fortement la quantité de protéine disponible pour former un

complexe avec l'ADN et donc une cassure double brin. Ainsi la surexpression de BMI1 pourrait induire une insensibilité face à un traitement à l'étoposide (Alchanati et al., 2009).

Pour finir la surexpression de BMI1 dans les cellules cancéreuses est très fréquemment considérée comme un facteur de mauvais pronostic (Cenci et al., 2012; Chowdhury et al., 2007; Farivar et al., 2013; Mihara et al., 2006). Dans certains cas, l'expression de BMI1 augmente avec l'acutisation de la maladie comme par exemple pour le cancer avancé de la prostate ou bien dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) (Bhattacharyya et al., 2009; Siddique et al., 2013).

IV. La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)

A. Origine de la maladie

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un désordre myéloprolifératif qui se caractérise par une expansion maligne et clonale de cellules différenciées de la moelle osseuse (Zalcberg et al., 1986). Cette expansion maligne conduit à une hyperleucocytose composée essentiellement de granulocytes neutrophiles, basophiles et éosinophiles ainsi que de leurs précurseurs immatures. La LMC trouve son origine dans la transformation d'une cellule souche hématopoïétique due dans plus de 90% des cas à la présence du chromosome de Philadelphie (Ph).

Ce chromosome a pour la première fois été identifié en 1960 par Nowell P. et Hungerford D.A puis caractérisé 13 ans plus tard par Rowley J.D comme résultant d'une translocation réciproque entre le chromosome 9 (région q34) et le chromosome 22 (région q11) noté t(9;22)(q34;q11) (Rowley, 1973) (Figure 8). Le potentiel oncogénique de cette translocation réside dans la fusion de deux gènes, *Breakpoint Cluster Region* (BCR) et *Abelson murine leukemia* (ABL), donnant ainsi BCR-ABL sur le chromosome 22 et ABL-BCR sur le chromosome 9. Seul le gène de fusion BCR-ABL, codant pour la protéine kinase BCR-ABL, est responsable de la pathologie de part son activité constitutive.

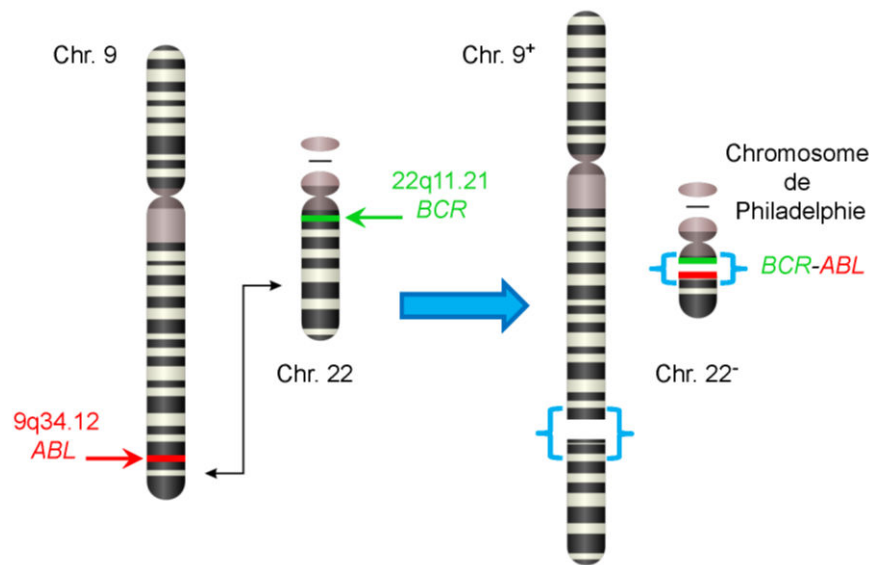


Figure 8. Schéma de la translocation à l'origine du chromosome de Philadelphie. Les chromosomes 9 et 22 sont ici représentés. La translocation $t(9;22)(q34;q11)$ consiste en la translocation d'une grande partie du brin long du chromosome 22 avec une petite partie de celui du chromosome 9. Ce défaut cytogénétique aboutit à la formation de 2 nouveaux chromosomes ; le chromosome 9^+ et le chromosome 22^- mieux connu sous le nom de chromosome de Philadelphie. Le chromosome de Philadelphie présente un nouveau gène issu de la fusion d'une partie de *BCR* avec une partie d'*ABL*, le gène *BCR-ABL*. Figure adaptée de Philadelphia_chromosome.jpg: by Master Uegly [CC-BY-SA-3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], via Wikimedia Commons.

Le chromosome de Philadelphie est également retrouvé dans 10-20% des leucémies aigues lymphoblastiques de l'adulte, 2-5% chez l'enfant, ainsi que dans de rares cas de leucémie myéloïde aigüe, de lymphome, myélome ainsi que chez quelques patients atteints de leucémie neutrophilique chronique (LNC) (Melo, 1996; Westbrook et al., 1992).

B. La LMC en clinique

La leucémie myéloïde chronique est une maladie peu fréquente ; on dénombre annuellement 1 cas pour 100 000 habitants au niveau mondial. L'incidence de la maladie augmente avec l'âge, elle est doublée après 40 ans et peut monter jusqu'à 9 cas pour 100 000 habitants au-delà de 75 ans. Cette leucémie n'est que très rarement retrouvée chez l'enfant et représente environ 20% des cas de leucémies à travers le monde. Les hommes sont plus fréquemment touchés par cette maladie (M : F = 1,5) et l'âge moyen au diagnostic est d'environ 64 ans (<http://seer.cancer.gov>). Aucun facteur de risque qu'il soit génétique ou environnemental n'a clairement été associé au déclenchement de cette maladie si ce n'est

l'exposition aux radiations comme cela à été observée chez les survivants des évènements nucléaires d'Hiroshima et de Nagasaki ou encore lors de la catastrophe de Tchernobyl (Hsu et al., 2013). L'exposition prolongée aux rayons X peut également être un facteur de risque pour la LMC (Corso et al., 1995).

Avant l'arrivée des thérapies ciblées dans les années 2000, la leucémie myéloïde chronique présentait une évolution en trois phases distinctes : la phase chronique (PC), la phase accélérée (PA) et enfin la phase blastique (PB) aussi appelée crise blastique.

- PC : environ 85% des patients au diagnostic sont en PC. La durée de cette phase varie en moyenne de 3 à 5 ans. Les patients en PC présentent fréquemment des signes de fatigue, une perte de poids, une splénomégalie, une hépatomégalie ainsi que des douleurs abdominales. La PC se caractérise par une augmentation des leucocytes différenciés ainsi que par un taux de blastes (cellules présentant des défauts de maturation) circulants inférieur à 10%.
- PA : la pathologie évolue en PA chez la plupart des patients (70%) et peut durer de 3 à 12 mois. Les symptômes évoqués ci-dessus s'aggravent et l'on retrouve également chez ces patients des signes d'anémie ainsi que des saignements. Cette phase de la maladie voit l'apparition de défauts cytogénétiques et de mutations secondaires dus à l'instabilité génique induite par BCR-ABL. Le taux de blastes circulant augmente jusqu'à 10-30%. Les traitements thérapeutiques utilisés sont moins efficaces lors de cette phase.
- PB : c'est la phase finale de la maladie. La médiane de survie est de 3 à 6 mois et à ce stade le seul traitement efficace est la greffe de moelle osseuse. Les patients présentent des signes de fièvre, des douleurs osseuses et des anémies, des thrombocytopénies et des granulopénies sévères. Ces derniers symptômes découlent directement d'un défaut majeur de la maturation des cellules et de l'augmentation importante des blastes leucémiques dans la circulation ainsi que dans la moelle osseuse. Lorsque la proportion en blastes dans la moelle osseuse dépasse les 30% on considère que la LMC a évolué en leucémie aiguë. En PB, les patients développent à 50% une leucémie aiguë myéloïde, à 30% une leucémie lymphocytaire B aiguë et plus rarement une leucémie érythrocytaire (Wong and Witte, 2004).

C. La protéine de fusion BCR-ABL

Le gène BCR :

Le potentiel oncogénique du chromosome de Philadelphie repose sur la formation du gène de fusion *BCR-ABL*. La protéine kinase BCR est ubiquitaire chez l'humain. Alors que le rôle de BCR a été très largement étudié dans le contexte de sa fusion avec ABL on ne sait que très peu de choses sur sa fonction physiologique lorsqu'il n'est pas associé au chromosome de Philadelphie. Bcr possède une activité sérine/thréonine kinase et joue le rôle de GTPase dans l'activation de RAC1 et CDC42, deux petites protéines G (Laurent and Smithgall, 2004; Zhang and Zheng, 1998). C'est à travers l'activation de ces petites protéines G que BCR pourrait réguler plusieurs facteurs de transcription comme NF- κ B (Montaner et al., 1998).

L'activité kinase de BCR-ABL est portée par l'extrémité C-terminale d'*ABL* contenant le domaine tyrosine kinase, tandis que *BCR* contient en N-terminal un domaine d'oligomérisation. Ce dernier domaine permet la dimérisation de BCR-ABL suivie d'une oligomérisation formant ainsi un tétramère permettant l'activation constitutive de la protéine de fusion BCR-ABL (McWhirter et al., 1993; Zhao et al., 2002b). En effet, cette oligomérisation est essentielle pour l'auto-phosphorylation de BCR-ABL sur le résidu tyrosine 177 qui est à l'origine de son activation constitutive et donc responsable de son pouvoir oncogénique (Chu et al., 2007).

Le gène ABL :

Le gène *ABL* code pour une tyrosine kinase de 145 kDa qui est exprimée de façon ubiquitaire chez l'humain et est retrouvée à la fois dans le cytoplasme et le noyau (Laneuville, 1995). Des fonctions très diverses et parfois opposées ont été attribuées à la protéine ABL. Elle peut être activée par plusieurs signaux extracellulaires (facteurs de croissance, cytokines, adhérence cellulaire...) ainsi que par des stimuli intracellulaires (dommage à l'ADN, stress oxydatif...). Une fois activée, et selon le type de signal reçu et le type cellulaire, ABL va stimuler la prolifération cellulaire ou la différenciation, la survie ou la mort de la cellule, la rétraction et la migration cellulaire (Wang, 2014). Ce grand nombre de processus impliquant ABL est à la fois imputable aux différentes voies de signalisation impliquées dans son activation ainsi qu'à la diversité de ses substrats (des protéines adaptatrices, des kinases, des

protéines du cytosquelette, des facteurs de transcription, des modificateurs de la chromatine...) (Colicelli, 2010).

De plus, le gène *ABL* peut être retrouvé fusionné à d'autres gènes que *BCR* ; ces gènes permettant également une oligodimérisation de la protéine de fusion et donc l'activation constitutive d'*ABL*. On retrouve parmi ces gènes *NUP214* ou *EML-1* dont la fusion avec *ABL* joue un rôle important dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de type T ; tandis que des fusions avec *RCSD1*, *SFPQ*, *ZMIZ1*, *FOXP1* ou encore *SNX2* sont fréquemment associées aux LAL-B. Pour finir la fusion d'*ABL* avec *ETV6* est retrouvée dans plusieurs types de leucémies (LAL-T, LAL-B, LMC, LAM) (Ernst et al., 2011).

Les différents variants du transcrit *BCR-ABL* :

Les cassures chromosomiques sur les chromosomes 9 et 22 au niveau des gènes *BCR* et *ABL* peuvent apparaître en divers endroits donnant ainsi des protéines de fusion légèrement différentes. Il existe 3 sites de cassures potentiels dans le gène *ABL*, tous compris dans sa partie terminale 5' et on retrouve 4 sites de cassures au niveau de la partie 3' du gène *BCR*. Parmi celles-ci la cassure entre les exons b2 et b3 que l'on retrouve chez la majorité des patients atteints de LMC et un tiers des LAL. Si l'on ne tient compte que de la partie BCR du gène de fusion il existe 4 transcrits pour *BCR-ABL* (Figure 9) :

- e1a2 qui est retrouvé dans très peu de LMC et LAM mais dans deux tiers des LAL Ph⁺ (Kantarjian et al., 1991). Ce transcrit code pour une protéine BCR-ABL de 190kDa appelé p190.
- e14a2 que l'on retrouve dans plus de 90% des cas de LMC et un tiers des LAL Ph⁺ et qui code pour une protéine BCR-AB de 210kDa, p210 (Ben-Neriah et al., 1986).
- e13a2 qui code également pour une protéine BCR-ABL de 210kDa.
- e19a2 qui code pour une forme de BCR-ABL de 230kDa (p230) et que l'on retrouve chez quelques patients atteints de LNC (Pane et al., 1996).

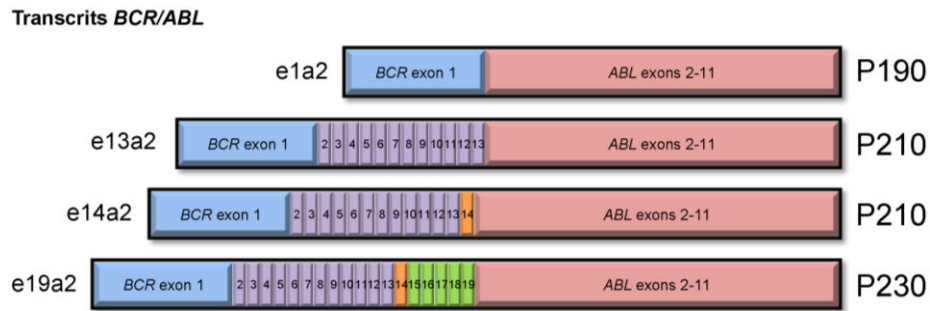


Figure 9. Les différents variants du transcrit *BCR-ABL*. Les exons du gène *BCR* sont représentés sur le schéma ci-dessus et numérotés de 1 à 19. Le transcrit P190 de *BCR-ABL* est composé de l'exon 1 du gène *BCR* et des exons 2 à 11 d'*ABL*. P210 sous la forme e13a2 comporte en plus du variant précédent les exons 2 à 13 de *BCR* tandis que la forme e14a2 possède en plus son exon 14. P230, le transcrit le plus long est constitué des exons 1 à 19 du gène *BCR* et tout comme les autres transcrits *BCR-ABL* les exons 2 à 11 d'*ABL*. Figure adaptée de Heisterkamp and Groffen, 2002.

En plus des variants possibles pour la protéine de fusion BCR-ABL, p190/p210/p230, il faut prendre en compte le niveau de différenciation de la cellule où a lieu la translocation pour présager du type de leucémie qui en découlera. En effet, p210 est retrouvée chez les patients atteints de LMC dans plusieurs types de précurseurs érythrocytaires et mégacaryocytaires suggérant que la translocation t(9 ;22) s'est effectuée dans un progéniteur hématopoïétique multipotent ou dans une CSH (Fialkow et al., 1977). À l'inverse, la forme p190 de BCR-ABL est retrouvée dans les cellules du compartiment lymphoïde et est essentiellement absente des cellules myéloïdes ce qui laisse à penser que la translocation est arrivée dans une cellule déjà engagée dans un processus de différenciation lymphoïde.

D. Modes d'action de BCR-ABL

Le pouvoir oncogénique de BCR-ABL repose essentiellement sur son activité tyrosine kinase qui lui permet d'activer de nombreuses voies de signalisation au sein de la cellule leucémique et ainsi de réguler plusieurs fonctions nécessaires à l'initiation et au maintien de la pathologie.

Stimulation de la survie et de la prolifération :

La protéine RAS appartient à la famille des petites protéines G qui sont des GTPases impliquées dans le relai des signaux des récepteurs de facteurs de croissances vers les voies métaboliques via des cascades de phosphorylations notamment celles des MAP kinases (ERK, SAPK et JNK). En interagissant avec des protéines adaptatrices permettant le recrutement de RAS, BCR-ABL est capable d'induire son activation à travers sa phosphorylation (Gishizky et al., 1995; Nichols et al., 1994; Sattler et al., 2002). L'activation de la voie RAS par BCR-ABL permet à la cellule leucémique de devenir indépendante des facteurs de croissance et ainsi de proliférer et d'échapper à l'apoptose via l'activation des MAP kinases. En effet, RAS phosphorylé peut activer les kinases ERK1 et ERK2 (via les protéines RAF et MEK) qui une fois dans le noyau vont phosphoryler plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la croissance cellulaire, tels que c-JUN, c-FOS, CREB et c-MYC (Steelman et al., 2004). L'activation d'ERK1/2 permet également aux cellules leucémiques d'échapper à l'apoptose via la phosphorylation stabilisatrice de la protéine anti-apoptotique BCL-2 et à l'inverse la phosphorylation de BIM qui induit la dégradation de ce membre pro-apoptotique par le protéasome (Dimmeler et al., 1999; Luciano et al., 2003). De la même façon, l'activation de la voie JAK/STAT est essentielle à la progression de la maladie via la surexpression de BCL-XL qui agit comme un facteur anti-apoptotique en maintenant l'intégrité membranaire de la mitochondrie et en prévenant l'activation des caspases (Harb et al., 2013)

BCR-ABL promeut également la survie et la prolifération des cellules leucémiques à travers l'activation de la voie PI3K/AKT. En phosphorylant la PI3 Kinase, BCR-ABL active AKT qui va participer à la perte de fonction du facteur de transcription FOXO3A responsable de l'expression de p27^{kip1} qui est impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire (Agarwal et al., 2008; Komatsu et al., 2003). En effet, p27^{kip1} est responsable de l'inhibition du complexe Cyclin D/CDK4 dont dépend l'inactivation du suppresseur de tumeur RB1. En son absence le complexe demeure actif et la progression du cycle cellulaire est maintenue. La protéine kinase AKT est également en amont de l'activation du complexe mTOR qui stimule alors la machinerie traductionnelle et la prolifération (Ly et al., 2003).

Perturbation de l'adhérence cellulaire :

La perturbation de l'adhérence cellulaire par BCR-ABL permet aux cellules leucémiques d'une part de migrer et donc une dispersion amplifiée mais aussi d'échapper à la régulation exercée par le stroma stimulant ainsi leur potentiel prolifératif. BCR-ABL est à l'origine de la répression de la Paxiline, de l'Intégrine- $\beta 1$ et d'ICAM, trois protéines impliquées dans des processus d'adhérence cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire (Lundell et al., 1996). De plus, BCR-ABL réprime le récepteur de la chimiokine CCR7 bloquant ainsi le chimiotaxisme permettant une migration régulée des cellules hématopoïétiques (Jongen-Lavrencic et al., 2005).

Stimulation de l'instabilité génétique :

La progression de la pathologie de la phase chronique vers la phase accélérée puis blastique dépend en grande partie de l'acquisition par les cellules de patients de défauts génétiques supplémentaires. La présence de BCR-ABL dans les cellules suffit à induire des dommages à l'ADN ainsi que des aberrations cytogénétiques (Laneuville et al., 1992). En activant la voie PI3K/mTOR, BCR-ABL contribue à l'augmentation du niveau de ROS dans les cellules où il est exprimé ce qui participe à l'augmentation des dommages à l'ADN (Kim et al., 2005; Sattler et al., 2000). BCR-ABL est également impliqué dans la perturbation de la réparation des mésappariements de nucléotides ou encore dans la réparation des cassures des brins d'ADN par jonction d'extrémités non-homologues (Gaymes et al., 2002). L'augmentation des dommages à l'ADN, via les ROS et la prolifération aberrante des cellules, et la perturbation de la machinerie sensée les réparer contribuent à l'acquisition de mutations et d'anomalies cytogénétiques supplémentaires qui vont renforcer l'évolution de la cellule vers un phénotype leucémique.

E. Thérapies

La leucémie myéloïde chronique est la première pathologie néoplasique à laquelle a pu être associée une anomalie génétique acquise, le chromosome de Philadelphie. Cette observation a conduit au début des années 1990s à une étude poussée du rôle de BCR-ABL

dans la leucémogénèse et la progression tumorale, notamment au travers de l'induction de son expression dans des modèles cellulaires et animaux (Lugo et al., 1990). Le fait que l'expression de BCR-ABL soit suffisante pour initier la pathologie et semble être à la base des mécanismes pro-tumoraux de ces cellules leucémiques a permis de mettre en place pour la première fois une thérapie dite « ciblée ». Jusque dans les années 1990s la majorité des thérapies anticancéreuses affectaient les cellules ayant un cycle cellulaire particulièrement actif ce qui est le cas de la majorité des cellules cancéreuses mais aussi de nombreuses cellules saines comme par exemple les cellules intestinales ou hématopoïétiques. Devant les nombreux effets secondaires que pouvaient présenter ces traitements, et avec l'avancée des connaissances sur la mise en place des pathologies cancéreuses et des protéines impliquées, la fin des années 1990s a vu l'émergence des thérapies ciblées. Comme leur nom l'indique ces thérapies sont dirigées, quand la pathologie le permet, vers des protéines cibles qui sont plus ou moins spécifiques des cellules cancéreuses, soit qu'elles y soient fortement surexprimées soit qu'elles résultent de translocations comme BCR-ABL. Du fait de leur spécificité relative ces thérapies sont en général plus efficaces et présentent moins d'effets secondaires que les autres traitements utilisés.

[Le mésylate d'Imatinib :](#)

C'est dans ce contexte que les laboratoires Novartis (encore nommés Ciba-Geigy à cette époque) développent en 1996 un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) spécifique de l'activité kinase de BCR-ABL, le mésylate d'imatinib (ou Gleevec®) (Druker et al., 1996). Cet inhibiteur est également efficace contre d'autres kinases comme PDGFR et c-KIT ce qui a permis son utilisation dans d'autres pathologies comme les tumeurs gastrointestinales stromales qui dépendent pour partie de ces kinases (Tuveson et al., 2001). Jusque là le traitement de référence de la LMC était l'interféron- α (IFN α) +/- Cytarabine C (un agent chimio-thérapeutique) ainsi que l'auto-greffe lorsque l'âge du patient le permettait ce qui est rare au vu de la médiane d'âge de la maladie. L'imatinib se montrant bien plus efficace que ces traitements et présentant moins d'effets secondaires, il devient très rapidement le traitement de première intention notamment pour les phases précoces de la maladie où il est le plus efficace. Contrairement aux phases les plus avancées de la maladie où l'on retrouve de nombreuses mutations et anomalies génétiques secondaires, impliquées dans la progression tumorale, les cellules de patients en phase chronique sont extrêmement dépendantes de BCR-

ABL (Druker et al., 2001; O'Dwyer and Druker, 2000). L'imatinib agit comme un inhibiteur compétitif de l'ATP, il se fixe au niveau du domaine catalytique porté par la partie ABL et stabilise BCR-ABL sous une forme inactive ([Figure 10](#)) (Schindler et al., 2000).

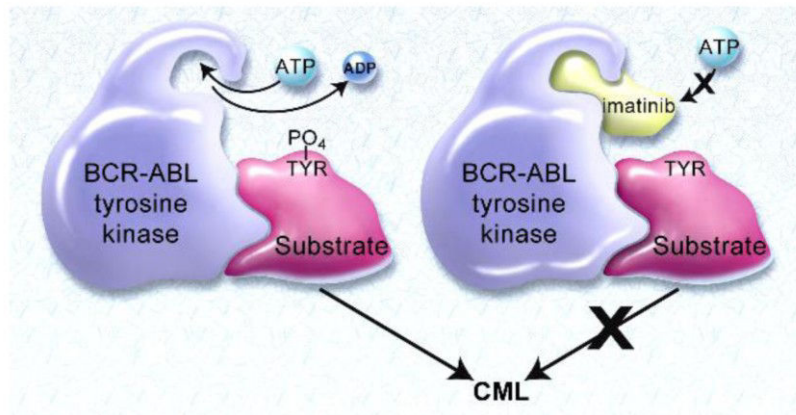


Figure 10. Mode d'action du Mésylate d'Imatinib. BCR-ABL est une protéine possédant une activité tyrosine kinase. Elle peut interagir avec une molécule d'ATP au sein de sa poche catalytique et transférer un groupement phosphate de celle-ci à un substrat. La réaction conduit alors au relargage d'une molécule d'ADP et à la phosphorylation d'un substrat cible de BCR-ABL. En entrant en compétition avec la molécule d'ATP pour interagir avec la poche catalytique de BCR-ABL, l'imatinib bloque l'activité enzymatique de cette dernière. BCR-ABL ne peut plus phosphoryler ses cibles ce qui conduit à l'inhibition des voies de signalisation en aval de BCR-ABL et à la mort des cellules leucémiques. Figure adaptée de Druker, 2008.

L'arrivée de l'imatinib est une réelle révolution pour les patients atteints de LMC. En effet, environ 75% des patients répondent au traitement et entrent en réponse cytogénétique complète, avec un chromosome Ph indétectable par test cytogénétique dans le sang ou la moelle osseuse (Druker and Lydon, 2000). Bien que ces résultats soient excellents environ 20 à 30% des patients ne peuvent être traités à long terme avec l'imatinib : soit ils ne tolèrent pas le traitement soit ils n'y sont pas sensibles ou développent des résistances.

Les mécanismes de résistance à l'Imatinib :

Ces résistances peuvent être dépendantes de BCR-ABL lui-même, il existe en effet environ 90 mutations possibles de son domaine kinase, à des fréquences diverses, pouvant rendre l'imatinib moins affine pour la kinase (Soverini et al., 2011). La plus fréquente étant la mutation T315I qui consiste en la substitution du résidu thréonine 315 par une isoleucine ce

qui empêche la liaison hydrogène permettant la fixation de l'imatinib au domaine catalytique de BCR-ABL (Gorre et al., 2001). L'ensemble de ces mutations comptent pour plus de 50% des types de résistances et sont majoritairement retrouvées dans les phases les plus avancées de la maladie (Shah et al., 2002). Plus rarement, l'amplification du gène *BCR-ABL* peut également être responsable d'une réponse moindre au traitement (Gorre et al., 2001). D'autres types de résistances sont indépendantes de BCR-ABL comme par exemple la diminution de la concentration intracellulaire de l'imatinib. Cette diminution peut trouver sa source dans la surexpression de transporteur responsable de l'efflux de l'imatinib comme la protéine transmembranaire ABCB1 que l'on retrouve dans les cellules de certains patients atteints de LMC (Mahon et al., 2000). La faible concentration intracellulaire en imatinib peut également être induite par la séquestration de la molécule dans le plasma causée par sa liaison avec la protéine AGP1 (Gambacorti-Passerini et al., 2000).

Un autre groupe de résistance est induit par l'acquisition d'une indépendance vis à vis de BCR-ABL par la cellule leucémique. Cette indépendance peut se retrouver dans l'acquisition secondaire de mutations ou de défauts cytogénétiques, comme par exemple une trisomie du chromosome 8 ou la formation d'un isochromosome 17, retrouvés chez certains patients ne répondant pas au traitement (Johansson et al., 2002). Pour finir, les cellules leucémiques peuvent se montrer indépendantes de BCR-ABL en suractivant des voies de signalisation en aval. On retrouve par exemple la surexpression de plusieurs kinases appartenant à la famille Src, comme Lyn et Fyn mise tout d'abord en évidence dans des lignées cellulaires de LMC avant d'être retrouvée chez les patients (Donato et al., 2003; Grosso et al., 2009; Mahon et al., 2008). D'autres protéines associées à cette voie de signalisation peuvent induire une résistance comme l'expression de la tyrosine kinase SYK ou encore du récepteur à tyrosine kinase AXL qui est surexprimé dans de nombreux cancers et fréquemment associé à la chimiorésistance (Gioia et al., 2011) (Linger et al., 2010).

[Les inhibiteurs de tyrosine kinases de seconde et troisième génération :](#)

Suite à l'arrivée de l'imatinib et au fort pourcentage de patients ne pouvant en bénéficier, des inhibiteurs de seconde génération (Nilotinib et Dasatinib) ont été développés. Ces ITK sont plus efficaces que l'imatinib, les patients y répondent plus rapidement et de façon plus importante. Plusieurs essais cliniques comparant le nilotinib et le dasatinib à l'imatinib montrent par exemple qu'en 12 mois 55%, 45% et 25% des patients respectivement

atteignent une réponse moléculaire majeure qui est une étape clé de la réponse au traitement (les transcrits du gène *BCR-ABL* sont réduits de 1000 fois et le nombre de cellules porteuses de la protéine BCR-ABL est également fortement réduit) (Signorovitch et al., 2014). L'efficacité de ces traitements est due à une plus grande affinité des ces molécules pour BCR-ABL et pour le cas du dasatinib à la capacité d'inhiber les kinases de la famille Src qui sont impliquées dans la signalisation en aval de BCR-ABL (Weisberg et al., 2007). Ces 2 ITK sont tellement efficaces qu'ils ont rejoint l'imatinib comme traitement de référence de première ligne pour les patients nouvellement diagnostiqués pour la LMC. Un autre inhibiteur de seconde génération, le bosutinib, a reçu son autorisation de mise sur le marché en 2013 pour les patients atteints de LMC qui ne répondent pas aux traitements de première ligne ou qui y sont intolérants (Cortes et al., 2011). Tout comme le dasatinib, le bosutinib est capable d'inhiber certaines kinases de la famille Src (Remsing Rix et al., 2009). Toutefois, bien que ces inhibiteurs soient efficaces dans plusieurs cas de résistance à l'imatinib, d'autres demeurent insensibles à ces molécules comme la mutation T315I.

Pour finir, des inhibiteurs de tyrosine kinases de troisième génération sont actuellement à l'étude comme le ponatinib qui semble actif contre les cellules de LMC présentant la mutation T315I ainsi que des mutations induisant des résistances aux ITK de seconde génération (Huang et al., 2010). Bien que très prometteur, ce médicament a vu sa commercialisation suspendue aux Etats-Unis après la publication d'une étude clinique de phase 2 : en effet, il semble avoir des effets secondaires trop importants notamment des problèmes vasculaires et thrombotiques (Cortes et al., 2013).

L'arrivée des thérapies ciblées a révolutionné le traitement des patients atteints de cancers. L'imatinib puis les inhibiteurs de tyrosine kinase de seconde génération ont permis de rallonger de façon très importante la durée de vie des patients en empêchant notamment l'évolution de la pathologie vers sa forme la plus aiguë. Les nouvelles molécules, en cours d'étude pour l'instant, devraient pouvoir répondre à la plupart des formes de résistances retrouvées chez les patients. La majorité des patients entrent en réponse moléculaire complète (RMC) ce qui signifie qu'aucun transcrit de BCR-ABL n'est détectable, avec les moyens actuellement utilisés, dans les prélèvements sanguins ou de moelle osseuse. Ces patients continuent cependant de prendre leur traitement ce qui peut à long terme avoir des effets secondaires particuliers et représente également un coût financier très important.

Le défi actuel dans le traitement de la LMC est justement l'arrêt de la prise d'ITK lorsque la maladie n'est plus détectable. En 2007, Rousselot et al ont publié une étude dans laquelle 12 patients atteints de LMC en RMC depuis au moins 2 ans ont vu leur traitement arrêté. La moitié d'entre eux ont rechuté dans les 6 premiers mois (transcrit de BCR-ABL de nouveau détectable) tandis que l'autre moitié ne présentait pas de signe de résurgence de la maladie même après 18 mois (Rousselot et al., 2007). Cette étude a montré que même si les ITKs avaient éliminé la majorité des cellules leucémiques, jusqu'à rendre indétectable la pathologie, il subsistait toutefois une population de cellules leucémiques capable de réinitier la maladie : des cellules initiatrices de leucémies (CIL), ou cellules souches leucémiques (CSL).

V. Cellules initiatrices de cancer (CIC)

La plupart des cancers se présentent sous une forme hétérogène. Il y a la majorité des cellules qui composent la tumeur qui sont plutôt matures, cyclent très fréquemment et qui en général répondent au traitement. À cela s'ajoute une population minoritaire, le plus souvent en état de quiescence, ne répondant pas au traitement et capable de réinitier la maladie à plus ou moins long terme (Figure 11). Ces dernières cellules présentent des caractères propres aux cellules souches notamment la capacité d'auto-renouvellement et sont appelés cellules initiatrices de cancers ou plus fréquemment cellules souches cancéreuses bien que l'utilisation de ce terme soit controversée (Hope et al., 2004). Dans le cadre de la LMC, la pathologie semble trouver son origine dans la transformation d'une cellule souche hématopoïétique ou dans une cellule immature multipotente puisque l'on retrouve la translocation à la source de BCR-ABL dans plusieurs types de cellules hématopoïétiques différenciées (Fialkow et al., 1977). Dans ce contexte, il paraît acceptable de parler de cellules souches leucémiques (CSL).

Plusieurs essais cliniques étudient la possibilité d'arrêter le traitement de patients atteints de LMC notamment après une période en RMC de plus de 2 ans (Mahon et al., 2010; Ross et al., 2013). Dans ces études, la moitié des patients rechutent après l'arrêt de l'imatinib, dans les 6 premiers mois pour la plupart d'entre eux. Des cas de rechutes ont également été rapportés plusieurs années (jusqu'à 5 ans) après une greffe allogénique que l'on pensait

pourtant capable de guérir la maladie (Olavarria et al., 2003). Ces cas de rechute, alors que la maladie n'est plus détectable, soutiennent le fait qu'une population résiduelle reste insensible aux traitements et demeure capable de se maintenir sur du long-terme et de réinitier la maladie. Ce raisonnement se trouve confirmé par le fait que de l'ADN génomique portant le gène *BCR-ABL* peut-être retrouvé chez des patients pourtant en RMC depuis plusieurs années (Chomel et al., 2011).

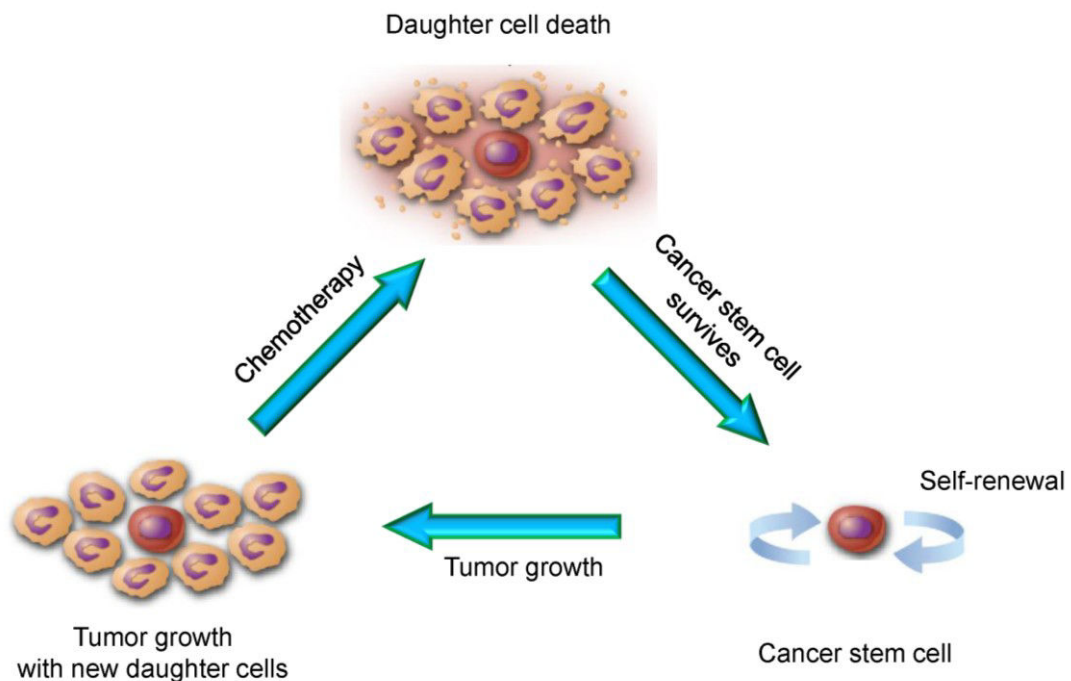


Figure 11. Les cellules souches cancéreuses à l'origine de la résurgence de la maladie. Lorsqu'une cellule souche devient leucémique elle est capable de générer un ensemble de cellules filles plus différenciées, invasives et capables de proliférer. Grâce à ses propriétés d'auto-renouvellement la cellule souche cancéreuse peut se maintenir sur le long-terme tout en conservant ses propriétés pathologiques. Lors d'un traitement chimiothérapeutique traditionnel, ciblant par exemple les cellules proliférantes, la majorité des cellules cancéreuses va être éliminée. Les cellules souches leucémiques qui ne sont généralement pas sensibles à ces thérapies survivent. Une fois le traitement stoppé ces cellules sont à l'origine de la résurgence de la maladie. Figure adaptée de Sekulic et al., 2008.

Les CSL échappent aux traitements :

Les CSL demeurent insensibles aux traitements utilisés. Elles ne sont en effet que peu ou pas sensibles aux ITKs que ce soit l'imatinib (Graham et al., 2002), le dasatinib (Copland et al., 2006), le nilotinib (Jorgensen et al., 2007) ou le bosutinib (Konig et al., 2008). Les causes de cette insensibilité aux ITKs sont multiples comme par exemple l'indépendance des

CSL via à vis de l'oncogène BCR-ABL ou encore la surexpression de transporteurs permettant l'efflux des molécules thérapeutiques comme *ABCB1* et à l'inverse le faible niveau d'expression de protéines comme *OCT1* permettant l'entrée de ces molécules dans la cellule (Corbin et al., 2011; Jiang et al., 2007).

Le micro-environnement composant la niche hématopoïétique (la région précise de la moelle osseuse où se maintiennent les CSH) est également affecté dans la LMC. Les cellules porteuses du gène de fusion *BCR-ABL* sécrètent de hauts niveaux d'ostéopontine, un composé de la niche hématopoïétique capable d'induire la quiescence des cellules souches normales ou leucémiques (Flamant et al., 2005). Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) se trouvent également dans la moelle osseuse et, bien que non porteuse du chromosome de Philadelphie, elles sont également affectées par la pathologie. En effet, contrairement aux CSM issues de sujet sain ces cellules sécrètent du PIFG (placental growth factor) qui soutient l'angiogénèse de la niche hématopoïétique ainsi que la prolifération des cellules leucémiques (Schmidt et al., 2011). Pour finir les CSL, du fait de l'expression de BCR-ABL, expriment également de faibles niveaux de CXCR4, un récepteur membranaire important pour les interactions avec le stroma qui est notamment impliqué dans le chimiotactisme. Un traitement à l'imatinib augmente l'expression de CXCR4 dans ces cellules ce qui conduit à leur attraction vers la niche hématopoïétique qui contribue, via la sécrétion de plusieurs cytokines, à leur survie (Jin et al., 2008).

La résurgence de la maladie induite par les CSL et leur résistance aux ITKs nécessitent l'étude de moyens alternatifs permettant leur élimination. Plusieurs laboratoires conduisent désormais des recherches dans le but de cibler plus particulièrement les voies moléculaires de maintien de ces cellules, comme par exemple les voies N-cadhérine/Wnt- β -catenin (Zhang et al., 2013), hedgehog (Dierks et al., 2008) ou encore STAT5 (Hoelbl et al., 2010).

L'hypothèse sur laquelle notre travail s'appuie est que les cas de rechutes lors de l'arrêt du traitement chez les patients atteints de LMC en réponse moléculaire complète proviennent des CSL. Ces CSL auraient échappé au traitement et de par leur faible nombre ou leur difficile accessibilité elles échapperaient également aux moyens de détections utilisés en clinique. Induire une perte de fonction des protéines impliquées dans le processus d'auto-renouvellement de ces cellules en soutien du traitement actuellement utilisé pourrait renforcer la thérapie. Sans auto-renouvellement la population souche de cette leucémie échouerait à se

maintenir sur le long terme et réduirait drastiquement les cas de résurgences de la maladie (Figure 12).

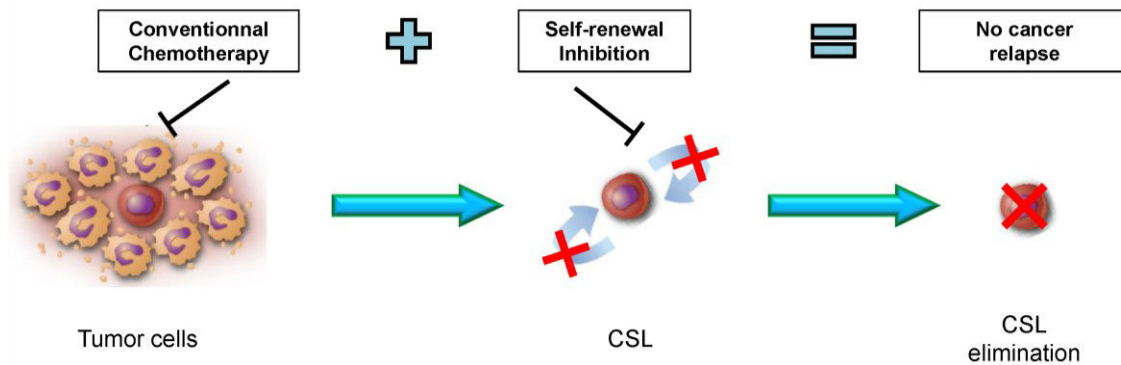


Figure 12. Cibler l’auto-renouvellement des CSL réduirait les cas de rechutes. Les thérapies conventionnelles, comme par exemple les ITKs dans le cas de la LMC, éliminent la majorité des cellules cancéreuses mais échouent à la suppression des CSL responsables des cas de résurgence de la maladie. Inhiber les capacités d’auto-renouvellement de ces cellules pourrait être la clef permettant l’abolition de leur maintien dans l’organisme. L’inhibition des propriétés propres aux cellules souches en conjugaison avec les agents chimiothérapeutiques existant devrait empêcher les cas de rechutes chez les patients ainsi traités.

C’est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés au rôle de BMI1 dans la LMC. Cette protéine est en effet nécessaire au maintien de l’auto-renouvellement à la fois des cellules souches hématopoïétiques mais aussi des cellules souches leucémiques (Lessard and Sauvageau, 2003; Park et al., 2003). De plus, BMI1 est impliqué dans la progression de la LMC de sa phase chronique vers les phases plus agressives de la pathologie (Bhattacharyya et al., 2009; Rizo et al., 2010).

Objectifs

Bien que l'importance de BMI1 dans les pathologies néoplasiques ne fasse aucun doute peu de choses sont connues sur sa fonction dans le cadre de la leucémie myéloïde chronique. Le peu d'études sur ce polycomb dans la LMC n'a pas déterminé son rôle précis si ce n'est qu'il semble lié à la progression tumorale, son expression étant plus importante dans les phases avancées de la maladie. De plus, BMI1 ne possédant pas d'activité enzymatique il est difficile de cibler pharmacologiquement cette protéine. Une meilleure compréhension du rôle de ce polycomb dans cette pathologie, ainsi que la recherche de moyens d'affecter sa fonction est donc nécessaire.

- Le premier objectif de ce travail de thèse a été de caractériser le rôle joué par BMI1 dans les cellules de LMC, de mettre en évidence les processus qu'il régule et de déterminer les cibles de ce répresseur transcriptionnel impliquées dans ces processus.
- Le deuxième objectif a consisté à mettre en évidence la voie de signalisation responsable de la surexpression de BMI1 dans la LMC, le but final étant de l'inhiber pharmacologiquement.
- Le dernier objectif de cette thèse a été de rechercher des agents pharmacologiques capables d'induire la réexpression des cibles réprimées par BMI1 et ainsi d'agir en aval de sa surexpression dans la LMC.

Résultats

VI. Objectif 1 : Caractériser le rôle de BMI1 dans la LMC et identifier ses cibles.

A. Présentation de l'étude et résumé

Le répresseur transcriptionnel BMI1 est un important oncogène retrouvé surexprimé dans de nombreux types de cancer. Dans le cas de la leucémie myéloïde chronique son niveau d'expression est directement corrélé à la progression de la pathologie vers ses formes les plus agressives (Bhattacharyya et al., 2009). Une grande part du pouvoir oncogénique de ce polycomb repose sur la répression du locus suppresseur de tumeur *CDKN2A*. De manière intéressante, ce locus est le deuxième suppresseur de tumeur le plus fréquemment retrouvé non fonctionnel dans les cancers après *TP53* (près de 30% des cas) (Baylin et al., 1998). La phase blastique de la LMC est souvent associée à une accumulation de défauts géniques secondaires parmi lesquels on retrouve des altérations du locus *CDKN2A*. Environ 35% des patients de LMC en phase blastique lymphoïde présentent une délétion homozygote au sein de ce locus (Hernandez-Boluda et al., 2003), ces délétions sont bien plus rares chez les patients dont la pathologie évolue en phase blastique myéloïde. On retrouve toutefois chez ces patients une hyperméthylation des promoteurs de ce locus ainsi que des mutations chez la moitié des patients (Nagy et al., 2003). La surexpression de BMI1 au cours de la progression de la pathologie, alors que sa cible principale est déjà réprimée, suggère que cette acutisation requiert la répression d'autres gènes suppresseurs de tumeur.

Dans cette étude, nous avons eu pour objectif d'identifier le rôle que pouvait avoir BMI1 au sein des cellules leucémiques. Nous avons pour cela utilisé une approche par ARN interférence dans des cellules de LMC présentant un locus *CDKN2A* non-fonctionnel dans le but de mettre en évidence des fonctions de BMI1 indépendantes de la répression de ce locus particulier. Le second but de ce travail a été d'identifier de nouvelles cibles de ce répresseur transcriptionnel impliquées dans la régulation des processus mis précédemment en évidence. Une analyse transcriptomique des gènes modulés par l'extinction de BMI1 nous a permis d'identifier la Cycline G2 comme une cible intéressante de BMI1.

Résumé de l'étude :

The BMI1 polycomb protein regulates self-renewal, proliferation and survival of cancer-initiating cells essentially through epigenetic repression of the CDKN2A tumor suppressor locus. We demonstrate here for the first time that BMI1 also prevents autophagy in Chronic Myeloid Leukemia (CML) cell lines, to support their proliferation and clonogenic activity. Using ChIP, we identified CCNG2/cyclin G2 (CCNG2) as a direct BMI1 target. CCNG2 was shown to act by disrupting the phosphatase 2A complex, which activates a PKC ζ -AMPK-JNK-ERK pathway that engages autophagy. We observed that BMI1 and CCNG2 levels evolved inversely during the progression of CML towards an acute deadly phase, and therefore hypothesized that BMI1 could support acute transformation of CML through the silencing of a CCNG2-mediated tumor suppressive autophagy response.

Keywords: BMI1; Autophagy; Cyclin G2; CDKN2A-independent.

B. Manuscrit

The BMI1 polycomb protein regulates autophagic process by repressing Cyclin G2 in chronic myeloid leukemia cells.

Lucas Mourgues^{1, 2, 4}, Véronique Imbert^{1, 2, 4}, Marielle Nebout^{1, 2, 4}, Pascal Colosetti^{1,3,4}, Zouhour Neffati^{1,2,4}, Patricia Lagadec^{1,2,4}, Chun Peng⁵, Estelle Duprez⁶, Véronique Maguer-Satta⁷, Franck-Emmanuel Nicolini⁸, Didier Mary^{1, 2, 4, £, *}, Jean-François Peyron^{1, 2, 4, £, *}

¹ INSERM, UMR1065 Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire C3M, Nice 06204, France

² Equipe Inflammation, Cancer, Cancer Stem Cells

³ Equipe Mort Cellulaire, Différenciation et Cancer

⁴ Université de Nice-Sophia Antipolis, UFR Médecine, 06204 Nice, France

⁵ Department of Biology, York University, Toronto, Ontario, Canada M3J 1P3

⁶ CRCM, U1068, INSERM, 13273 Marseille, France

⁷ CNRS, UMR5386, INSERM, U1052, 69373 Lyon, France

⁸ Service d'Hématologie, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, 69310 Pierre Bénite, France

£ These authors share senior co-authorship

*Correspondence: mary@unice.fr (D.M.), peyron@unice.fr (J-F.P.)

Running title

BMI1 blocks autophagy through cyclin G2 silencing

Keywords: BMI1; Autophagy; Cyclin G2; CDKN2A-independent

The authors declare no conflict of interest.

Significance

To perpetuate themselves by self renewal and at the same time generate mature functional progeny, stem cells have to avoid differentiation, apoptosis and senescence. By repressing these functions, the BMI1 polycomb protein appears crucial to maintain quiescence and stemness. Besides, BMI1 also supports cancer stem cells functions and indeed, the polycomb is overexpressed in numerous cancers, frequently associated with an unfavorable prognosis. Here, we demonstrate a new important function for BMI1 that is to repress autophagy which appears as a brake to leukemic proliferation and clonogenic activity in Chronic Myeloid Leukemic (CML) cell lines. We hypothesize that the repression of an autophagic tumor suppressor response by BMI1 could be an important step during evolution of CML from a chronic to an acute deadly phase.

Introduction

The BMI1 polycomb and transcriptional repressor exerts an epigenetic control over cell fate, development and transformation (1). BMI1 is preferentially expressed in stem cells such as hematopoietic stem cells (HSC) (2), to support self-renewal. Transgenic mice expressing BMI1 have enhanced self-renewal of HSC (3), while inactivation of BMI1 results in long term hematopoiesis failure because of impaired HSC self-renewal (3-5). BMI1 was first identified as an oncogene, cooperating with *c-MYC* to induce mouse lymphomas (6). Overexpression of BMI1 in a lymphocyte specific manner induces T cell lymphomas (7). BMI1 is also crucial for leukemogenesis as *BMI1*^{-/-} HSC, transformed with *Hoxa9* and *Meis1a* genes, failed to generate leukemia into secondary hosts because of proliferation arrest, differentiation and apoptosis (4). It has recently been demonstrated that pharmacological targeting of BMI1 interferes with colon cancer tumor formation by affecting self-renewal of cancer-initiating cells (8).

A major target of BMI1 is the *CDKN2A* locus that encodes the tumor suppressor genes *p16INK4A* and *p14ARF*. By repressing *CDKN2A*, BMI1 prevents engagement of RB1 and TP53 pathways, allowing progression through the cell cycle, maintenance of stemness and restriction of differentiation (9). If the dual deletion of *Ink4A* and *Arf* genes almost completely restores *BMI1*^{-/-} HSC survival (10), prevents senescence of *BMI1*-deficient MEFs (11) and blocks transformation of hematopoietic progenitors by the *E2a-Pbx1* oncogene (12), it did not

always lead to a complete rescue of *BMI1*^{-/-} phenotypes, suggesting the implication of other BMI1-controlled loci. Transformation by BMI1 can be observed in the absence of a functional *CDKN2A* in glioblastoma (13). In MCF10A human mammary epithelial cells, BMI1 cooperates with the *H-RAS* oncogene to induce transformation independently of *CDKN2A* (14).

The *CDKN2A* locus is one of the most frequently lost gene in human cancer (30% of cases), in particular during cancer progression (15). The CML blast crisis is associated with the acquisition of additional genetic/epigenetic defects and in particular with loss of *CDKN2A* function as the promoters of *p16INK4A* and *p14ARF* genes are frequently silenced by methylation during disease progression from the chronic phase (CP) to accelerated phase (AP) (16, 17). Meanwhile, expression of BMI1 in CML primitive cells increases gradually during CML transformation (18) which strongly suggests that BMI1 exert control over other important, tumor suppressor, loci.

We used the K562 CML cellular model that harbors a deletion of the *CDKN2A* locus (19) to search for new modes of action for BMI1. Here we demonstrate that BMI1 represses an autophagic response that interferes with proliferation and clonogenicity and depends on the atypical cyclin G2. These results highlight a new function for BMI1 that could be relevant to the physiopathology of leukemic stem cells.

Materials and Methods

Cell lines. The human CML lines JURL-MK1 and LAMA-84 and K562 (ATCC) were grown at 37°C under 5% CO₂ in RPMI 1640 medium supplemented with 5% fetal calf serum, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, and 1 mM sodium pyruvate. K562 cells (Tet-K562) expressing the Tetracycline repressor by stable transfection of the pCDNA6-TR plasmid (Invitrogen) was described (20). T lymphoma cell line KO99 described elsewhere (21) was grown in RPMI 1640 medium supplemented with 20% FCS.

BMI1 silencing by short hairpin RNA interference. Two shRNA-expressing plasmids were constructed using the following sequences: sh-A: 5'-CAACCAGAATCAAGATCACTGA-3'; sh-B: 5'-GGAAGAGGTGAATGATAAA-3'. Oligonucleotides (Eurogentec) were annealed and cloned into the pTER vector using *Bgl*III and *Hind*III restriction sites. The resulting tet-on inducible shRNA vector was then stably transfected into Tet-K562 cells (100µg/ml zeocin) (A1-K562).

BMI1 and CCNG2 overexpression. K562 cells mRNA was extracted and reverse-transcribed by RT-PCR. *BMI1* cDNA was specifically amplified by PCR with the following sequences: 5'-GAGATATCCATCGAACAACGAGAATCAA-3' and 5'-TCTCGAGTCAACCAGAA GAAGTTGCCTGAT -3' before cloning into the pcDNA.3 vector (Invitrogen) using the *Eco*RI and *Xho*I restriction sites. The *CCNG2* gene was extracted from pEGFP-N1 vector (22) and inserted in pcDNA4-TetOn (Invitrogen) by using *Eco*RI and *Sac*II restriction sites (CCNG2-TO).

CCNG2 silencing. A mammalian expression vector (pBluGFP) was constructed to simultaneously express a siRNA species against CCNG2 as well as GFP (22). K562 and derivatives were transfected with either pBluGFP or pBluGFP-CCNG2siRNA together with a pGL4 vector carrying a puromycin resistance gene before selection with puromycin (0.5 mg/ml).

Cell transfection. CML cell lines (10^6 cells) were transfected with 1µg of indicated vectors using the Nucleofactor Amaxa protocol T16 and kit V (LonzaAG).

Xenograft growth assay. K562 variants ($5 \cdot 10^6$ in 0.2ml PBS, 40% matrigel) were subcutaneously injected to NMRI female nude mice (6 weeks old, Janvier) that were randomized into two groups of 12 animals.

WST-1 assay. Cell metabolism was determined using a WST-1 based Colorimetric assay (Roche Diagnostics). Cells (20×10^3 cells/100µl) were incubated in a 96-wells plate with effectors. The WST-1 reagent added to each well is transformed into an orange formazan dye (490 nm) by metabolically active cells. Each assay was performed in quadruplicate.

DNA Synthesis Assay. DNA synthesis was determined using an ELISA bromodeoxyuridine (BrdU) kit according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics). Cells (20×10^3 cells/100 µl) were incubated in a 96-well plate with effectors before fixing, denaturation, addition of anti-BrdU antibody and monoclonal antibody anti-BrDu conjugated with peroxidase before colorimetric detection at 450 nm.

Colony formation assay. Cells were grown in semi solid methyl cellulose medium (3×10^3 cells; MethoCult H4230; StemCell Technologies Inc). Colonies were detected after 7 days by adding 1 mg/ml of MTT reagent and scored by the Image J software. Each condition was done in quadruplicates. For re-plating experiments, one well was dissolved in RPMI 10%SVF before centrifugation at 1200 rpm. Cells were then resuspended in the same medium, numerated, re-plated at 3×10^3 cells/ml in Methocult for a new period of 7 days.

Confocal microscopy. K562 cells were stably transfected with a mammalian expression vector to express LC3-RFP protein fusion (20). Cells were spun on microscope slides 10min at 800g. After air drying cells are fixed with paraformaldehyde 4% and permeabilized with Triton X-100 0.1%. Cells were then hybridized with specific conjugated antibodies, mounted on coverslips and analyzed by confocal microscopy on a Zeiss LSM 510 Meta at the C3M cell imaging facility (INSERM U1065, Nice, France).

May-Grünwald Giemsa (MGG) staining. Cells were spun onto a microscope slide 10min at 800g in a Cytospin 4 apparatus (Shandon Thermo Electron Corp). After air drying, slides were stained with MGG reagents from Sigma (St Louis, MO, USA).

ImmunoPrecipitation. CCNG2-TO cells stimulated or not with $1 \mu\text{g/ml}$ for 48h were lysated in a weakly stringent buffer (40mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.2% Nonidet P-40, 20mM EDTA, 1mM DTT and phosphatase/protease inhibitors). 1mg of lysate was combined with $25 \mu\text{l}$ of protein A/G magnetic beads (Fisher Scientific), pre-coupled with $2 \mu\text{g}$ of different antibody, over night at 4°C . After washing, proteins complexes bound by antibody/beads were fragmented by incubation with Laemmli buffer for 5 minutes at 95°C . Protein interaction was analyzed by western blotting.

Affymetrix GeneChip analysis. RNA were isolated using the Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen). RNA quality was first checked by using an Agilent Bioanalyser (Agilent Technologies). cDNA was generated from $5 \mu\text{g}$ of total RNA. Biotinylated cDNA was generated and fragmented according to the Affymetrix protocol and hybridized to HG-U133 Plus2 human arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). After scanning of the GeneChip arrays, the expression values were normalized on a per-sample basis using the Affymetrix MAS5 algorithm. Experimental data and associated microarray designs from tymocytes of wild type mice and tPTEN^{-/-} mice were done elsewhere (21).

Real-time quantitative PCR. After reverse transcription following manufacturer's instructions (Invitrogen) real-time quantitative polymerase chain reaction (RTQ-PCR) analysis was performed on a StepOne Plus Real Time PCR system. Complementary DNAs were amplified in quadruplicate using the SYBR Green Master Mix reagent (Promega) and specific primer. Primers against HPRT were designed using PRIMER Express Software (Applied Biosystems), and sequences are available upon request. Primers against BMI1, CyclinG2 and Actin were purchased from OriGene. Semi-logarithmic plots were constructed of delta fluorescence versus cycle number. For analysis, a threshold was set for change in fluorescence at a point in the linear PCR amplification phase (Ct). The differences in the Ct values (Δ CT) between the transcript of interest and endogenous control (*RPLP0*) were used to determine the relative expression of the gene in each sample and the $\Delta\Delta$ CT method was used to calculate fold expression.

Chromatin Immunoprecipitation assay. ChIP was performed using the SimpleChIP enzymatic chromatin IP kit (Cell Signaling, Danvers, MA) according to the manufacturer's protocol. For one chromatin preparation, 4×10^7 K562 cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. Subsequently, nuclei were isolated by lysis of the cytoplasmic fraction, and chromatin was digested into fragment of 150-900 bp by micrococcal nuclease for 20 min at 37°C and nuclear membrane was disrupted by sonification (three times at 40% amplitude for 20 sec using a Vibra Cell 75022, Bioblock, Illkirsh, France). 5-10 μ g of total chromatin was incubated overnight at 4°C with Pierce Protein A/G magnetic beads (88802, Thermo Scientific) pre-coupled with 4 μ g of the respective antibodies. Antibody-DNA complexes were eluted from the beads and digested by 40 μ g of proteinase K for 2h at 65°C. Chromatin was purified by spin column-based. DNA bound was finally assessed by qRT-PCR. Triplicate biological repeats were measured each in triplicate. ChIP qPCR results obtained were compared with IgG ChIP by $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method and normalized to human RPL30 Exon3 control (7014, Cell Signaling). The *CCNG2* promoter sequence (gene ID: 21826; Prom ID: 116051) was consulted on transcriptional regulatory database (TRED) (23). qRT-PCR primers used to ChIP analysis were designed with Primer 3 (v0.4.0) software (24). Primer sequences are provided in the next table.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean $\pm$ sd. Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test with $P < 0.05$ deemed as statistically significant. All experiments were repeated at least

three times unless otherwise stated. The non-parametric Mann-Whitney *U* test was performed to assess the difference of tumor volume between control and treatment group in xenograft experiments.

Results

Inducible knockdown of BMI1 affects proliferation, metabolism, clonogenicity and induces an autophagic response in K562 human CML cells

Cells of the K562 human CML line were engineered to stably express the Tet repressor and a pTer vector coding a shRNA against BMI1 to allow for an inducible downregulation of BMI1 (shBMI1-TO) upon addition of doxycycline (doxy). An important decrease (47%) in A1-K562 cell proliferation was observed upon BMI1 knockdown (insert), evaluated by counting viable cells over a 20 days period (Figure 1A). After 20 days of culture, clone-A1 cells were washed out and put back into culture (Figure 1B). Removal of doxy resulted in a complete recovery of a normal proliferation rate. By contrast, proliferation remained lower in cells kept under doxy that displayed lower BMI1 levels. BMI1 knockdown in A1-K562 cells resulted in a 37% decrease in cell metabolism (Figure 1C) and a lower (41%) proliferation assessed by BrdU incorporation (Figure 1D). ShBMI1 inducible cells implanted in the flanks of nude mice which were then treated intraperitoneally every 3 days with doxy, which was also present in drinking water. Doxy strongly affected tumor development by 72% (Figures 1E). Induction of the shBMI1 in cells was associated with a 40% decrease in the number of colonies in a semi-solid methylcellulose assay (Figure 1F). After 7 days, cells from each condition were seeded at the same density in three new wells for serial replating. Doxy gradually decreased A1-K562 colony numbers by 40%, 62% and 78% after 3 replating steps while the number of colonies remained constant in untreated cells. The absence of senescence and apoptotic processes (not shown), as well as the reversibility of the biological events that follow BMI1 silencing, prompted us to investigate autophagic events. After 5 days of shBMI1 induction in A1-K562 cells, we detected the presence of cells with vacuoles by MGG staining (Figure 1G). Vacuolated cells were also detected after stimulation with PMA in the presence of the SB202190 p38 MAPK inhibitor, a combination which had been shown to trigger autophagy in K562 cells (20). Besides, by using K562 cells expressing an RFP-LC3, we observed that

down regulation of BMI1 resulted in the appearance of LC3-II foci that correspond to the relocalization of RFP-LC3 into autophagosomes (Figure 1H).

BMI1 directly represses cyclin G2 expression

To visualize BMI1 target genes a gene profiling experiment was performed on the A1-K562 CML cell line that harbors a deletion of *CDKN2A*. cDNA from A1-K562 cells, incubated or not with doxy to downregulate BMI1, were hybridized to Affymetrix Arrays. Among several upregulated genes (Figure 2A), we selected *ccng2*/cyclin G2 for further study as expression of this gene has been associated with cell cycle arrest. Treatment of A1-K562 cells with doxy resulted in a 0.7 decrease in *BMI1* and a 3 fold increase in *CCNG2* mRNA expression (Figure 2B). Moreover, stimulation of K562 cells for 48hours with PRT4165, the small molecule inhibitor of PRC1 (25) gave a similar rise in *CCNG2* expression (Fig. 2C). At protein levels, the decrease in BMI1 was also associated with a higher expression of CCNG2 in vitro (Figure 2D) and in vivo in xenografted A1-K562 tumors from mice treated with doxy (Figure 2E). A confocal analysis (Figure 2F) clearly showed a nuclear localization of BMI1 in untreated A1-K562 cells while CCNG2 was barely detected. The induction of shBMI1 associated a strong decrease in BMI1 levels with an appearance of CCNG2 with a cytoplasmic localization. On the other hand, ectopic expression of BMI1 in K562 cells came along a markedly decreased expression of CCNG2 (Figure 2G) and an enhanced proliferation (not shown). A Chromatin immunoprecipitation assay showed that BMI1, within the PRC1 complex, binds to the *ccng2* promoter near the Transcription Start Site (TSS) (Figure 2H). In order to verify that this mechanism was not restricted to the K562 cell line, we analyzed the BMI1/CCNG2 ratio in different cellular models. Transient knocked down of BMI1 in the JURL-MK1 and LAMA-84 human CML cell lines by 2 shRNA species also resulted in a higher expression of CCNG2 (Fig. S1A), which was associated with a strong inhibition of DNA synthesis (Fig. S1B). The analysis of transcriptomic profiles from normal mouse thymocytes (WT, n=3), compared with those of tumors from 4 PTEN deficient mice showed that *BMI1* levels were significantly upregulated in *tPten*^{-/-} tumors, while inversely, expression of *Ccng2* appeared downregulated (Fig. S1C). Moreover, incubation of a T lymphoma cell line (KO99) derived from a primary *tPten*^{-/-} tumor (21) with the BMI1-RING1b specific inhibitor PRT 4165 strongly reduced DNA synthesis (Fig. S1D).

CCNG2 mediates the anti-proliferative effects of BMI1 knockdown

To verify that CCNG2 is implicated in the biological functions regulated by BMI1, A1-K562 cells were stably transfected by a GFP-siCCNG2 vector (Supplementary Fig. S2A and S2B). Silencing of CCNG2 strongly rescued the clonogenic ability of BMI1-knocked down cells (76% after two replating steps) (Figure 3A) and completely abolished the anti-proliferative effect of BMI1 down-regulation (Figure 3B). By sharp contrast, the metabolic activity was rescued by only 46% (Figure 3C). We then monitored the effect of modulating BMI1 and CCNG2 in a cell cycle analysis. No obvious differences were observed on asynchronous cells (Fig. S2C). Cells were then stopped at the G1/S boundary by a double thymidine block and then allowed to re-enter the cell cycle that they completed in about 25h. It was consistently found that cells expressing a shBMI1 were slower to exit the G0/G1 block under doxy (red box, 3rd and 4th columns) than control cells (Fig. S2C). We then examined the implication of CCNG2 in the autophagic process observed after BMI1 silencing. The extinction of CCNG2 markedly decreased the number of vacuolated cells observed in Doxy-stimulated A1-K562 cells (Figure 3D). Besides, downregulation of BMI1 was associated with an increase in phosphorylation of AMPK α and a conversion of LC3-I into LC3-II, a hallmark of autophagy (Figure 3E). Remarkably, silencing of CCNG2 totally abrogated these two events. To further investigate the direct implication of CCNG2 on cellular functions, we developed a CCNG2 inducible model in K562 cells (CCNG2-TO). Induction of ectopic CCNG2 (Figure 4A) induced a 70% reduction of DNA synthesis (Figure 4B), a 50% reduction of cell metabolism (Figure 4C) and a 50% decrease in the clonogenic capacity of the cells (Figure 4D, 2 vs 1). This last effect was reversible as washing the cells out from doxy before replating restored a normal colony forming capacity (4: 119%) while maintaining the drug kept the number of colonies at 51% of control (3). We next examined whether CCNG2 by itself could induce autophagy in K562 cells. Stimulation of the CCNG2-TO cells with doxy resulted in an important cell vacuolization (Figure 4E). Ectopic CCNG2 expression was also associated with stimulation of AMPK phosphorylation and with increased protein levels for beclin which is involved in phagophore isolation; for ATG5, ATG7 and ATG12-ATG5 complexes which take part in autophagosome elongation (Figure 4F). Moreover, by using K562 cells expressing an RFP-LC3, we observed that ectopic expression of CCNG2 resulted in the appearance of LC3-II foci corresponding to the relocalization of RFP-LC3 into autophagosomes (Figure 4G). These results demonstrate that CCNG2 can induce several crucial molecular steps involved in the initiation of autophagosomes formation at the onset of autophagy. Furthermore, the

p62/SQSTM1 adaptor that mediates recruitment of LC3 into autophagosomes was shown to accumulate in the presence of Bafilomycin A1 (Figure 4H) arguing that CCNG2 stimulated the autophagic flux. Knockdown of AMPK (Figure S3A) counteracted the effect of CCNG2 induction on the decrease in proliferation (Figure S3C), metabolism (Figure S3D) and clonogenicity (Figure S3E). Silencing BECN1 (Figure S3B) appeared more efficient to rescue these parameters (Figure S3C, D and E). These results show that by acting on AMPK and BECN1, CCNG2 can engage the cells in an autophagic response.

Association of CCNG2 with the phosphatase 2A complex induces activation of PKC ζ that stimulates autophagic pathways

CCNG2 was described to bind phosphatase 2A (PP2A) (26) that was demonstrated to control activation of PKC ζ (27). In untreated CCNG2-TO cells, the Aa and Ac subunits of the PP2A complex were associated and PKC ζ associated only with the PP2Aa subunit (Figure 5A). Addition of doxy was followed by a strong association of ectopic CCNG2 with the PP2Ac subunit, with a concomitant separation of the two phosphatase subunits and a release of PKC ζ from PP2Aa subunit. At the same time we observed that ectopic CCNG2 expression was associated with an increased phosphorylation of PKC ζ , ERK1/2 and JNK2/3 (Figure 5B). Small molecule inhibitors were then used to block each of the three kinase pathways (Figures S4A, S4B and S4C). The blockade of the JNK pathway strongly rescued the effects of CCNG2 induction on the decrease in DNA synthesis (Figure S4D) and in clonogenicity (Figure S4E), while inhibition of AMPK and of ERK1/2 were slightly less efficient (Figure S4D, E). An inhibitory cell permeant PKC ζ pseudosubstrate, PKC ζ PS prevented phosphorylation of AMPK, ERK1/2 and JNK2/3 (Figure 5B) and strongly rescued the inhibitory effects of ectopic-CCNG2 expression on DNA synthesis (Figure 5C) and clonogenicity (Figure 5D). Furthermore, cell vacuolization observed following CCNG2 induction did not occurred in the presence of PKC ζ PS (Figure 5E). Altogether these results support a key mediator role of PKC ζ in the autophagic flux regulated by AMPK, JNK and ERK1/2 kinases following expression of CCNG2.

CML progression is associated with increased levels of *BMII* and decreased levels of *CCNG2* and *ATG7*

BMI1 levels were described to gradually increase during CML progression from chronic phase (CP) to accelerated phase (AP) and blast crisis (BC) (18).

We first examined the expression levels for *BMII* and *CCNG2* in data extracted from a gene expression profiling study on CML patients (29) (Figure 6A). We found that as *BMII* mean levels increased in BC samples, *CCNG2* levels comparatively decreased. Interestingly, 5 patients in remission after BC displayed lower levels of *BMII* compared to BC patients and again, while levels of *CCNG2* increased towards those of CP.

We next checked the relative expression of *BMII* and *CCNG2* in primary CP and AP samples from the same patient. We found an inverse evolution of the two genes in 4 patients out of 5 (Figure 6B). *BMII* has a tendency to increase in AP (from 104 a.u to 282 a.u) while *CCNG2* levels were consistently lower in AP compared to CP (from 40 a.u to 8 a.u) for the 5 patients analyzed. We also observed that the progression of the disease was associated with a decreased level of *ATG5* in 4 patients out of 5 (Figure 6C) and of *ATG7* in all 5 patients (Figure 6D). No significant differences could be observed for beclin (not shown). The results suggest that expression of *BMII* and *CCNG2* could be functionally linked during CML aggravation while two genes that are important for autophagy induction are frequently down regulated.

Discussion

We show here for the first time that the BMI1 polycomb protein is a repressor of autophagy by inhibiting the expression of the atypical cyclin G2. BMI1 is a known crucial regulator of stem cell fate by supporting their self-renewal, proliferation and survival (9). Although BMI1 acts principally through repression of the *CDKN2A* locus to block engagement of the RB1 and TP53 tumor suppressors (15), it also mediates important functions independently of this locus. BMI1 can protect cells from a DNA damage response that would lead to premature ageing

and early death, by regulating ROS homeostasis at the mitochondrial level (30). BMI1 can repress apoptosis by down-regulating the expression of the pro-apoptotic genes *BIM* (31) or *NOXA* (32). In glioblastoma, transformation by BMI1 does not require *CDKN2A*, although the resulting tumors have a later time of onset and a lower grading (13) and in MCF10A human mammary epithelial cancer cells, BMI1 cooperates with the H-Ras oncogene to induce transformation independently of *Ink4a/ARF* (14).

In the human K562 CML cell line that harbors a deletion of the *CDKN2A* locus (19), we show that decreasing BMI1 levels by RNA interference, or blocking the BMI1-RING1b activity, resulted in the reversible down regulation of cell proliferation and clonogenic activity, without induction of apoptosis. A transcriptomic approach on shBMI1-K562 cells revealed the enhanced expression of the *CCNG2* gene which appeared of interest because i) it is induced by DNA-damage (33), ii) it is up-regulated under conditions of cell cycle arrest or apoptosis (34) and iii) it mediates the anti-proliferative actions of the TGF- β -like nodal ligand in an ovarian cell line (22). Furthermore, *CCNG2* expression was shown to be decreased in several solid tumors from thyroid (35), oral (36), prostate (37), colon (38) carcinomas suggesting that *CCNG2* could exert a global tumor suppressor role. Using ChIP, we demonstrated that BMI1 directly binds the *CCNG2* promoter, close to the transcription initiation site. The induction of *CCNG2* after BMI1 knock down was also observed in two other CML lines: JURL-MK1 and LAMA-84. In a T-cell lymphoma model, we noticed an inverse correlation between the two genes as BMI1 was overexpressed and *CCNG2* down-regulated in the PTEN deficient tumors. Importantly, we could demonstrate by two independent approaches, using RNAi or inducible *CCNG2* expression, that *CCNG2* mediates the effects of BMI1 knockdown on K562 cell proliferation and clonogenicity without affecting mitochondrial metabolic activity. Moreover, knockdown of BMI1 as well as *CCNG2* ectopic expression both triggered an autophagic response that was evidenced by increased elements involved in autophagosome elongation such as formation of LC3-II foci, Beclin1, ATG5, ATG7 expression. Autophagy is a protective response when cells face starvation conditions but it can also participate in differentiation, metabolism reprogramming and cell death, depending on the cellular context (39). It appears to be at the crossroad of different behaviors in HSC as some constitutive autophagy appears important for maintaining HSCs genomic integrity (40) while on the other side, an excessive autophagy can lead to cell death. Also, autophagy appears to exert tumor suppressive functions as the lack of autophagy in the hematopoietic system after specific deletion of *Atg7* was shown to interfere with stem cell functions and to cause an abnormal

myeloproliferation (41). Moreover, several genes that are central to autophagy have been reported to be deleted in various cancer cells. For instance, *ATG5* is decreased in patients with melanoma (42) while *BECN1* (beclin1) is mono-allelically deleted in breast and ovarian cancers (43). As BMI1 is crucial to stemness, it could be envisioned that in normal HSCs the repressive action of BMI1 on *CCNG2* and autophagy is important to limit unwanted differentiation or cell death that would exhaust the stem cell compartment. During malignant transformation, an overexpression of BMI1 and the following silencing of *CCNG2* and the tumor suppressive function of autophagy, would promote tumoral progression. CML evolution from the chronic phase to blast crisis could be a representative example of such processes. CML acceleration is associated with enhanced *BMI1* expression and decline in *CCNG2* levels suggesting that an increase in the *BMI1/CCNG2* ratio and therefore an impaired autophagy could be important for disease progression. In addition, we also observed a decreased *ATG5* and *ATG7* expression in CML acute phase that could reflect a lower capacity of these cells to mount an autophagic response. At a functional level, we observed that ectopic *CCNG2* could associate with the PP2A phosphatase C subunit as it was already reported (26). This binding of *CCNG2* to PP2A-C comes with the release of PKC ζ that can then activate downstream AMPK, JNK and ERK pathways, as observed in other models (44) (45) (46). Moreover, PKC ζ inhibition could efficiently rescue *CCNG2*-induced proliferation and clonogenicity defects as well as prevent vacuolization. Our observations are summarized on a model shown on Fig.7, where BMI1, within the PRC1 complex, represses autophagy by blocking the expression of *CCNG2*. This new function adds *CCNG2* to the panel of tumor suppressive genes that are repressed by BMI1 such as the *CDKN2A* and *PTEN* (47). Understanding the regulatory roles of BMI1 during the functional interplay between self-renewal, proliferation, senescence and now autophagy, will be an important step towards manipulation of these functions to support normal stem cells and eliminate cancer stem cells.

Accession number

GSE54262

Acknowledgments

We are grateful to:

Malek Djabali (UMR5088 CNRS, Toulouse, France) for helpful discussion during early phases of the project; Hans Clevers (Hubrecht Laboratory, Utrecht, The Netherlands) for the kind gift of the pTER vector; Agnès Loubat for help in cell cycle analysis; Patrick Auberger, Arnaud Jacquel and Sandrine Obba for helpfull discussion concerning autophagy; Catherine Frelin for critical review of the manuscript.

We acknowledge the C3M imaging core facility (Microscopy and Imaging Platform Côte d'Azur) and the C3M animal room facility.

Grant support: The C3M is supported institutional grants from INSERM. LM is supported by a grant from the French Ministry of Research and a 4th year PhD grant from the Société Française d'Hématologie (SFH).

References

1. Sparmann A & van Lohuizen M (2006) Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature reviews Cancer* 6(11):846-856.
2. Hosen N, *et al.* (2007) Bmi-1-green fluorescent protein-knock-in mice reveal the dynamic regulation of bmi-1 expression in normal and leukemic hematopoietic cells. *Stem Cells* 25(7):1635-1644.
3. Iwama A, *et al.* (2004) Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* 21:843-851.
4. Lessard J & Sauvageau G (2003) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423:255-260.

5. Park I, *et al.* (2003) Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423:302-305.
6. van Lohuizen M, *et al.* (1991) identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 31:737-752.
7. Raaphorst F, Otte A, & Meijer J (2001) Polycomb-group genes as regulators of mammalian lymphopoiesis. *Trends in Immunology* 22:682-690.
8. Kreso A, *et al.* (2014) Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer. *Nat Med* 20(1):29-36.
9. Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, & van Lohuizen M (2004) Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 118(4):409-418.
10. Oguro H, *et al.* (2006) Differential impact of Ink4a and Arf on hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment in bmi-1-deficient mice. *J Exp Med* 203:2247-2253.
11. Jacobs J, Kieboom K, Marino S, RA D, & van Lohuizen M (1999) The oncogene and Polycomb-group gene Bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 397:164-168.
12. Smith K, *et al.* (2003) Bmi-1 regulation of INK4A-ARF is a downstream requirement for transformation of hematopoietic progenitors by E2a-Pbx1. *Molecular Cell* 12:393-400.
13. Bruggeman SW, *et al.* (2007) Bmi1 controls tumor development in an Ink4a/Arf-independent manner in a mouse model for glioma. *Cancer cell* 12(4):328-341.
14. Hoenerhoff M, *et al.* (2009) BMI1 cooperates with H-RAS to induce an aggressive breast cancer phenotype with brain metastases. *Oncogene* 28:3022-3032.
15. Kim W & Sharpless N (2006) The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 127:265-275.
16. Kusy S, Larsen CJ, & Roche J (2004) p14ARF, p15INK4b and p16INK4a methylation status in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia & lymphoma* 45(10):1989-1994.

17. Nagy E, *et al.* (2003) Frequent methylation of p16INK4A and p14ARF genes implicated in the evolution of chronic myeloid leukaemia from its chronic to accelerated phase. *Eur J Cancer* 39(16):2298-2305.
18. Bhattacharyya J, *et al.* (2009) Bmi-1 expression is enhanced through transcriptional and posttranscriptional regulation during the progression of chronic myeloid leukemia. *Ann Hematol* 88:333-340.
19. Rui H & Su J (2002) Co-transfection of p16^{INK4a} and p53 genes into the K562 cell line inhibits cell proliferation. *Haematologica* 87:136-142.
20. Colosetti P, *et al.* (2009) Autophagy is an important event for megakaryocytic differentiation of the chronic myelogenous leukemia K562 cell line. *Autophagy* 5(8):1092-1098.
21. Lounnas N, *et al.* (2013) Pharmacological inhibition of carbonic anhydrase XII interferes with cell proliferation and induces cell apoptosis in T-cell lymphomas. *Cancer Lett* 333(1):76-88.
22. Xu G, *et al.* (2008) Cyclin G2 is degraded through the ubiquitin-proteasome pathway and mediates the antiproliferative effect of Activin Receptor-like Kinase 7. *Mol Biol Cell* 19:4968-4979.
23. Zhao F, Xuan Z, Liu L, & Zhang MQ (2005) TRED: a Transcriptional Regulatory Element Database and a platform for in silico gene regulation studies. *Nucleic acids research* 33(Database issue):D103-107.
24. Rozen S & Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-386.
25. Ismail IH, McDonald D, Strickfaden H, Xu Z, & Hendzel MJ (2013) A small molecule inhibitor of polycomb repressive complex 1 inhibits ubiquitin signaling at DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 288(37):26944-26954.
26. Arachchige Don A, *et al.* (2006) Cyclin G2 is a centrosome-associated nucleocytoplasmic shuttling protein that influences microtubule stability and induces a p53-dependent cell cycle arrest. *Exp Cell Res* 312:4181-4204.

27. Wu SC & Solaro RJ (2007) Protein kinase C zeta. A novel regulator of both phosphorylation and de-phosphorylation of cardiac sarcomeric proteins. *J Biol Chem* 282(42):30691-30698.
28. Xiao H, *et al.* (2013) MEK/ERK pathway mediates PKC activation-induced recruitment of PKCzeta and MMP-9 to podosomes. *Journal of cellular physiology* 228(2):416-427.
29. Radich JP, *et al.* (2006) Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8):2794-2799.
30. Liu J, *et al.* (2009) Bmi-1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature* 459:387-392.
31. Jagani Z, *et al.* (2010) The Polycomb group protein Bmi-1 is essential for the growth of multiple myeloma cells. *Cancer Research* 70:5528-5538.
32. Yamashita M, *et al.* (2008) Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the Noxa gene. *J Exp Med* 205:1109-1120.
33. Bates S, Rowan S, & Vousden K (1996) Characterization of human cyclin G1 and G2 : DNA damage inducible genes. *Oncogene* 13:1103-1109.
34. Martinez-Gac L, Marques M, Garcia Z, Campanero M, & Carrera A (2004) Control of cyclin G2 mRNA expression by forkhead transcription factors : novel mechanism for cell cycle control by phosphoinositide 3-kinase and forkhead. *Mol Cell Biol* 24:2181-2189.
35. Ito Y, *et al.* (2003) Decreased expression of cyclin G2 is significantly linked to the malignant transformation of papillary carcinoma of the thyroid. *Anticancer Research* 23:2335-2338.
36. Kim Y, Shintani S, Kohno Y, Zhang R, & Wong D (2004) Cyclin G2 dysregulation in human oral cancer. *Cancer Research* 64:8980-8986.
37. Cui DW, Cheng YJ, Jing SW, & Sun GG (2013) Effect of cyclin G2 on proliferative ability of prostate cancer PC-3 cell. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.

38. Sun GG, Zhang J, & Hu WN (2013) CCNG2 expression is downregulated in colorectal carcinoma and its clinical significance. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.
39. Boya P, Reggiori F, & Codogno P (2013) Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* 15(7):713-720.
40. Warr MR, Kohli L, & Passegue E (2013) Born to survive: autophagy in hematopoietic stem cell maintenance. *Cell Cycle* 12(13):1979-1980.
41. Mortensen M, Watson AS, & Simon AK (2011) Lack of autophagy in the hematopoietic system leads to loss of hematopoietic stem cell function and dysregulated myeloid proliferation. *Autophagy* 7(9):1069-1070.
42. Liu H, He Z, & Simon HU (2014) Autophagy suppresses melanoma tumorigenesis by inducing senescence. *Autophagy* 10(2):372-373.
43. Aita VM, *et al.* (1999) Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 59(1):59-65.
44. Xie Z, Dong Y, Scholz R, Neumann D, & Zou MH (2008) Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation* 117(7):952-962.
45. Muscella A, Greco S, Elia MG, Storelli C, & Marsigliante S (2003) PKC-zeta is required for angiotensin II-induced activation of ERK and synthesis of C-FOS in MCF-7 cells. *Journal of cellular physiology* 197(1):61-68.
46. Garin G, *et al.* (2007) Flow antagonizes TNF-alpha signaling in endothelial cells by inhibiting caspase-dependent PKC zeta processing. *Circulation research* 101(1):97-105.
47. Song LB, *et al.* (2009) The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells. *J Clin Invest* 119(12):3626-3636.

Figure legends

Figure 1. Knockdown of BMI1 inhibits biological parameters in K562 cells

(A) A1-K562 cells expressing shBMI1 were stimulated (grey) or not (black) by 1µg/ml doxycycline (doxy) and counted at indicated times.

(B) At the end of experiment A, cells were washed twice and resuspended in fresh medium additionned (grey) or not (black dashed and solid lines) with doxy before counting.

(C) Metabolic activity of A1-K562 cells measured 10 days after stimulation or not with doxy.

(D) Proliferation analysis of A1-K562 cells (BrdU immunoassay) 4 days after stimulation or not with doxy.

(E) Tumor growth of A1-K562 cells after implantation (5×10^6) on the flank of nude mice treated with doxy (IP 3 times a week: 1µg/ml; drinking water: 100µg/ml) (black square) or vehicle (black diamond). Non-parametric Mann-Whitney U test: * $p < 0.047$.

(F) Doxy (1µg/ml) was added or not to A1-K562 cells seeded in methyl cellulose medium (3×10^3 cells/ml). Colonies were counted after 7 days. Results are % of control $\pm$ SD of 3 different determinations. Every 7 days, cells from each condition were resuspended in fresh medium before replating without/with doxy. Error bars represent SEM for 3 biological replicates. * $p < 0.05$; Student's t test.

(G) K562 cells were left untreated (NT) or incubated with a combination of PMA (10 ng/ml) and Sb202190 (Sb, 5µM) for 24h to induce vacuolization (arrows), detected after May-Grunwald-Giemsa (MGG) staining. A1-K562 cells with a control shRNA (shGFP) or a shBMI1 were stimulated or not with doxy for 5 days.

(H) K562 cells stably expressing RFP-LC3 (red) were left untransfected (NT), stimulated by PMA+Sb (24h), transfected with a control shRNA (shGFP) or a shBMI1 (72h). Cells were analyzed using a confocal microscope. DAPI was used to visualize nuclei.

Figure 2. Knockdown of BMI1 directly regulates CCNG2 expression in K562 cells

(A) Dot Plot of gene expression in A1-K562 after shBMI1 induction by doxy (1 μ g/ml) for 4 days.

(B) A1-K562 cells were stimulated or not with doxy for 4 days. Gene expression was studied by semi-quantitative RT-PCR analysis.

(C) K562 cells were stimulated or not with indicated concentration of PRT4165 (PRT) for 24 hours. Gene expression was studied by semi-quantitative RT-PCR analysis. Amplification of *ACTIN* was used as a control. Ratio *CCNG2/ACTIN* is indicated.

(D) A1-K562 cells were stimulated or not with doxy for indicated time. Cell lysates were analyzed by specific immunoblotting.

(E) Western blot analysis of BMI1 and CCNG2 expression in dissected tumors from xenograft experiment (one tumor of each condition is displayed).

(F) Immunofluorescence detection of BMI1 (green) and CCNG2 (red) in A1-K562 cells stimulated or not with doxy for 4 days.

(G) Overexpression of BMI1 was induced by transient mycBMI1 transfection in K562 cells. After two days, ectopic BMI1 and CCNG2 levels were evaluated by immunoblotting with anti-myc epitope and anti-CCNG2 antibodies.

(H) ChIP from K562 cells using BMI1 or CBX8 antibodies. Positions of A-D amplicons in the *CCNG2* promoter are displayed below the graph.

Figure 3. Expression of CCNG2 is required to inhibit proliferation, metabolism and clonogenicity and to promote autophagic process after BMI1 silencing.

(A, B and C) Biological analysis of A1-K562 cells stably expressing an empty vector (CT) or a siRNA against CCNG2 (siCCNG2). Doxy was added when indicated for 4 days. Quantification of clonogenicity **(A)**, proliferation **(B)** and metabolic activity **(C)**.

(D) A1-K562 cells with empty vector (CT) or siCCNG2 were stimulated or not with doxy for 5 days. Lower panel: K562 cells stimulated by a combination of PMA (10 ng/ml) and Sb202190 (Sb, 5 μ M) for 24h to induce vacuolization (arrows). Cells were stained by MGG.

(E) Cells lysates of A1-K562 cells with empty vector (CT) or siCCNG2 stimulated 4 days or not with doxy were examined by immunoblotting.

Error bars represent SEM for 3 biological replicates. * $p < 0.05$; Student's t test.

Figure 4. Ectopic CCNG2 inhibits proliferation, metabolism and clonogenicity and promotes autophagy in K562 cells

(A) Western blot analysis of ectopic CCNG2 induction in CCNG2-TO K562 cells after stimulated or not with doxy for 2 days.

(B and C) CCNG2-TO cells stimulated for 4 or 7 days were analyzed for proliferation (B) and metabolic activity (C).

(D) Clonogenic capacity of CCNG2-TO cells was examined after 7 days, under CCNG2 induction (2: doxy 1 $\mu\text{g/ml}$) or not (1). Cells from the doxy-stimulated condition (2) were replated for 7 additional days, with (3) or without (4) doxy. Quantification of the number of colonies is shown on the right.

(E) Visualization of vacuolization (MGG staining) in CCNG2-TO cells treated 3 days without or with doxy.

(F) CCNG2-TO cells cultured for 3 days without or with doxy were stimulated with AICAR (0.5 mM) for the last 18 hours when mentioned. Expression of indicated proteins was visualized by immunoblotting.

(G) K562 cells stably expressing RFP-LC3 (red) were transfected with an empty vector (pcDNA4) or a vector expressing CCNG2 (72h). Cells were analyzed using a confocal microscope. DAPI was used to visualize nuclei.

(H) CCNG2-TO cells cultured for 3 days without or with doxy were stimulated with Bafilomycin A1 (Baf A1) (10 nM) for the last hour when mentioned. Expression of indicated proteins was visualized by immunoblotting.

Error bars represent SEM for 3 biological replicates. * $p < 0.05$; Student's t test.

Figure 5. CCNG2 binds PP2Ac to release PKC ζ that stimulates AMPK, JNK and ERK pathways required for autophagy

(A) CCNG2-TO cells were cultured for 3 days without/with doxy. Lysates were immunoprecipitated with either non relevant IgG, myc-tag (CCNG2), PP2Ac or PKC ζ antibodies and analyzed for protein content by Western blotting with indicated antibodies. Protein contents in total lysates are indicated (left column).

(B) CCNG2-TO cells stimulated without/with doxy, were incubated in the presence of PKC ζ PS (5 μ M) for the last 6 hours. Phosphorylation and expression levels of indicated proteins were measured by Western blotting.

(C and D) Biological analyses of CCNG2-TO cells incubated without/with doxy in the presence of PKC ζ PS (5 μ M) for the last 18h. Proliferation measured after 3 days (C) and clonogenicity after 7days (D). The extent of the rescue effect induced by PKC ζ PS is indicated.

(E) Visualization of vacuolization (MGG staining) in CCNG2-TO cells treated as in Figure 4C-D.

Error bars represent SEM for 3 biological replicates. * $p < 0.05$; Student's t test.

Figure 6. BMI1 level inversely correlates with CCNG2, ATG5 and ATG7 expression in CML

(A) Gene expression profiling data from CML patients at different leukemic stages (GSE4170) were extracted using the R software.

(B, C and D) RNA from patients were prepared from BM or PB mononuclear cells from 5 CML patients at the chronic (light grey) or acute phase (dark grey). *BMI1*, *CCNG2* (B), *ATG5* (C) and *ATG7* (D) RNA levels were assessed by real time PCR. Columns: mean of quadruplicate samples. Similar results were obtained in 2 independent experiments.

Figure 7. Proposed signaling model for BMI1 control of autophagic induction

Induction of CCNG2 by BMI1 silencing disrupts the PP2A phosphatase complex to liberate PKC ζ which becomes active and stimulates AMPK, JNK and ERK that initiate

autophagosome isolation. Recruitment of LC3 II and ATG5-ATG12 complex can in turn contribute to autophagosome elongation and biogenesis.

Figure 1

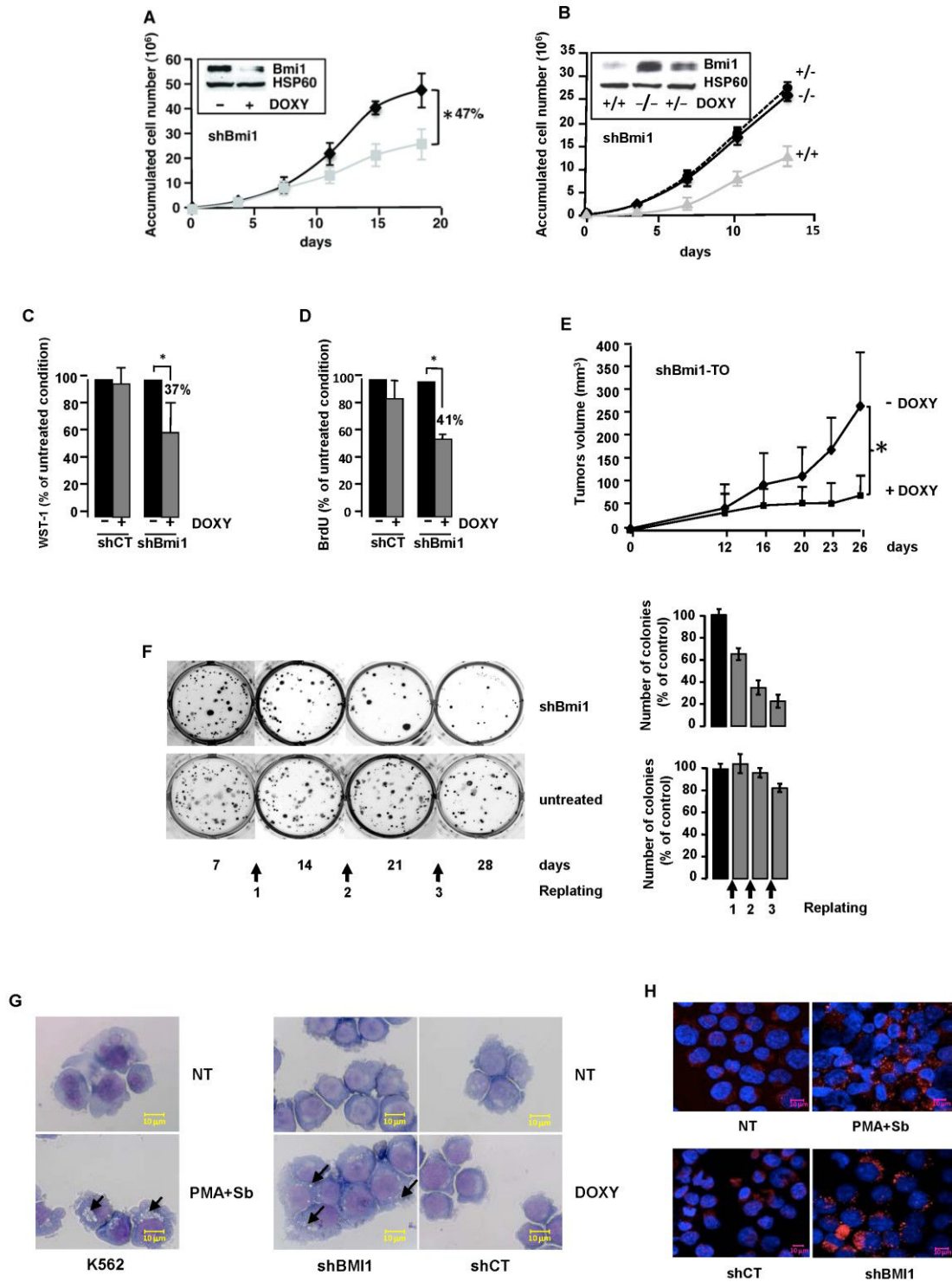


Figure 3

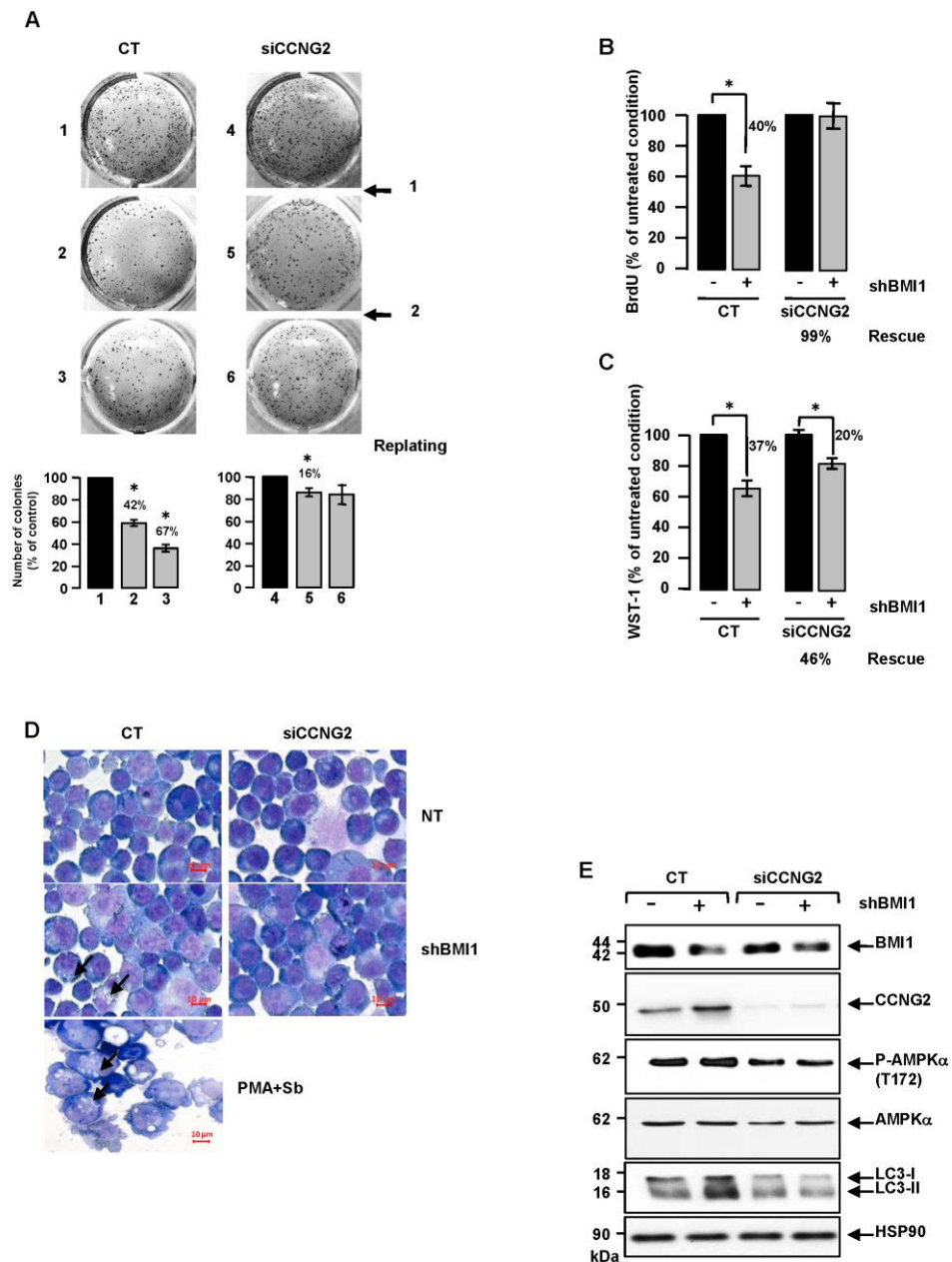


Figure 2

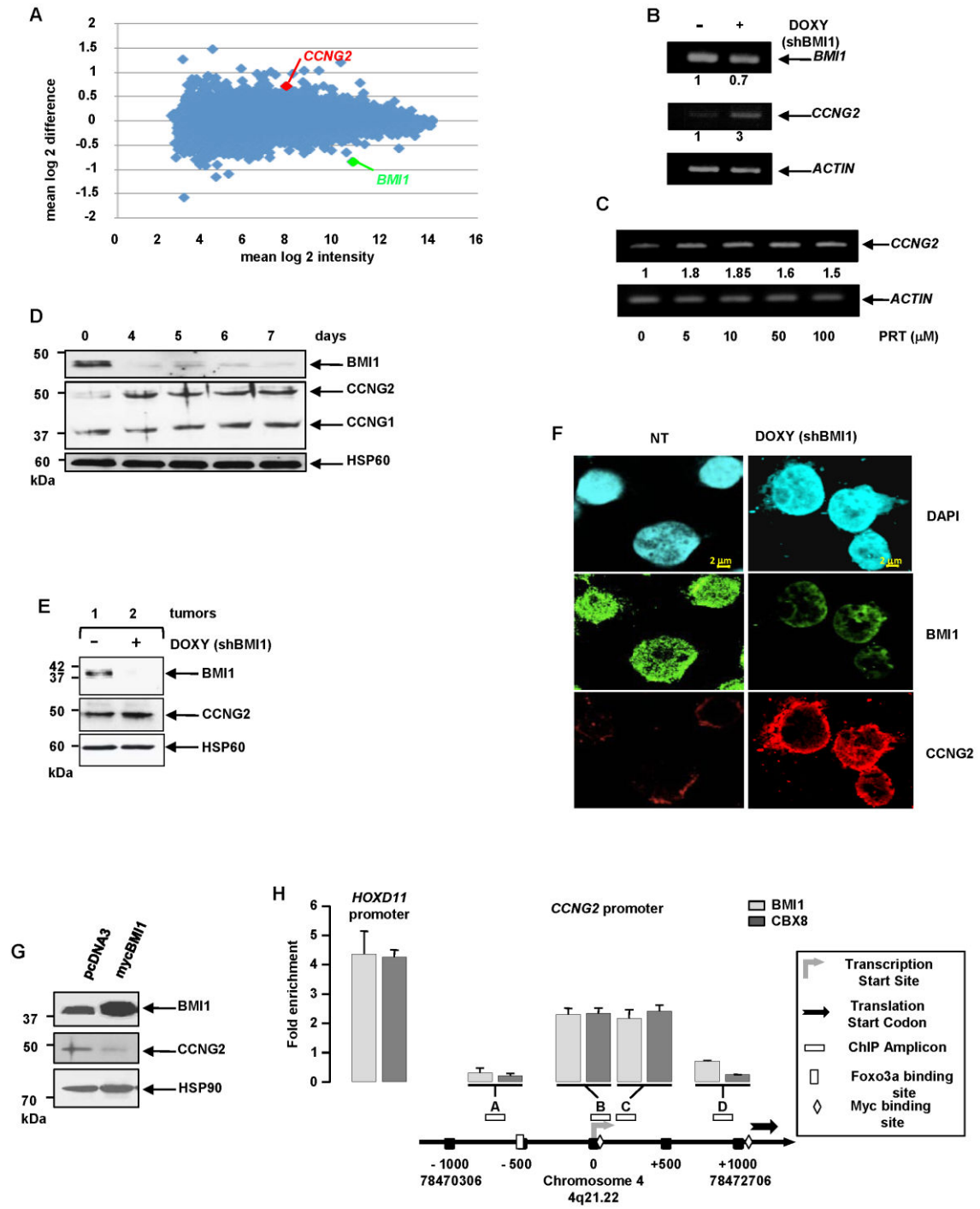


Figure 4

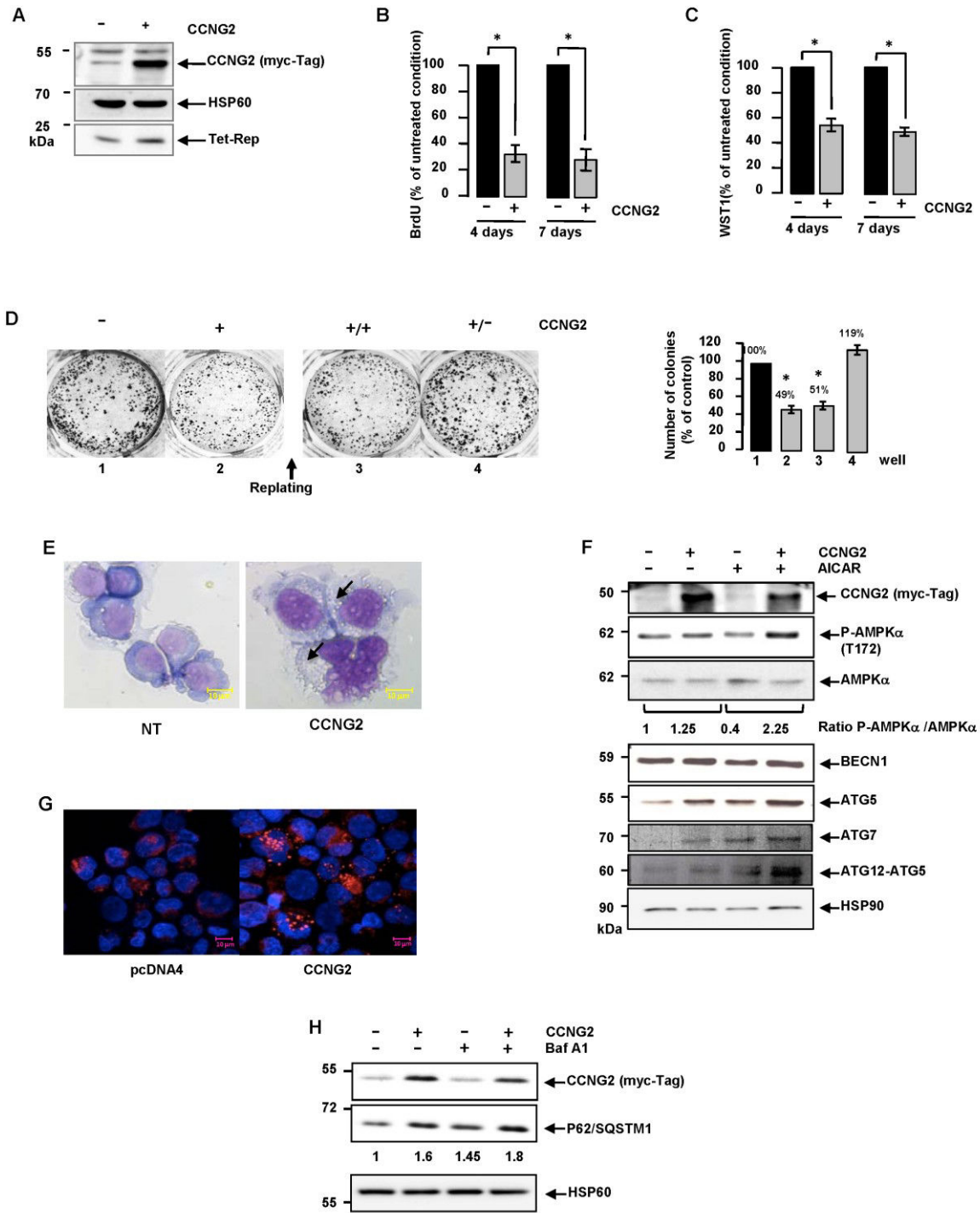


Figure 5

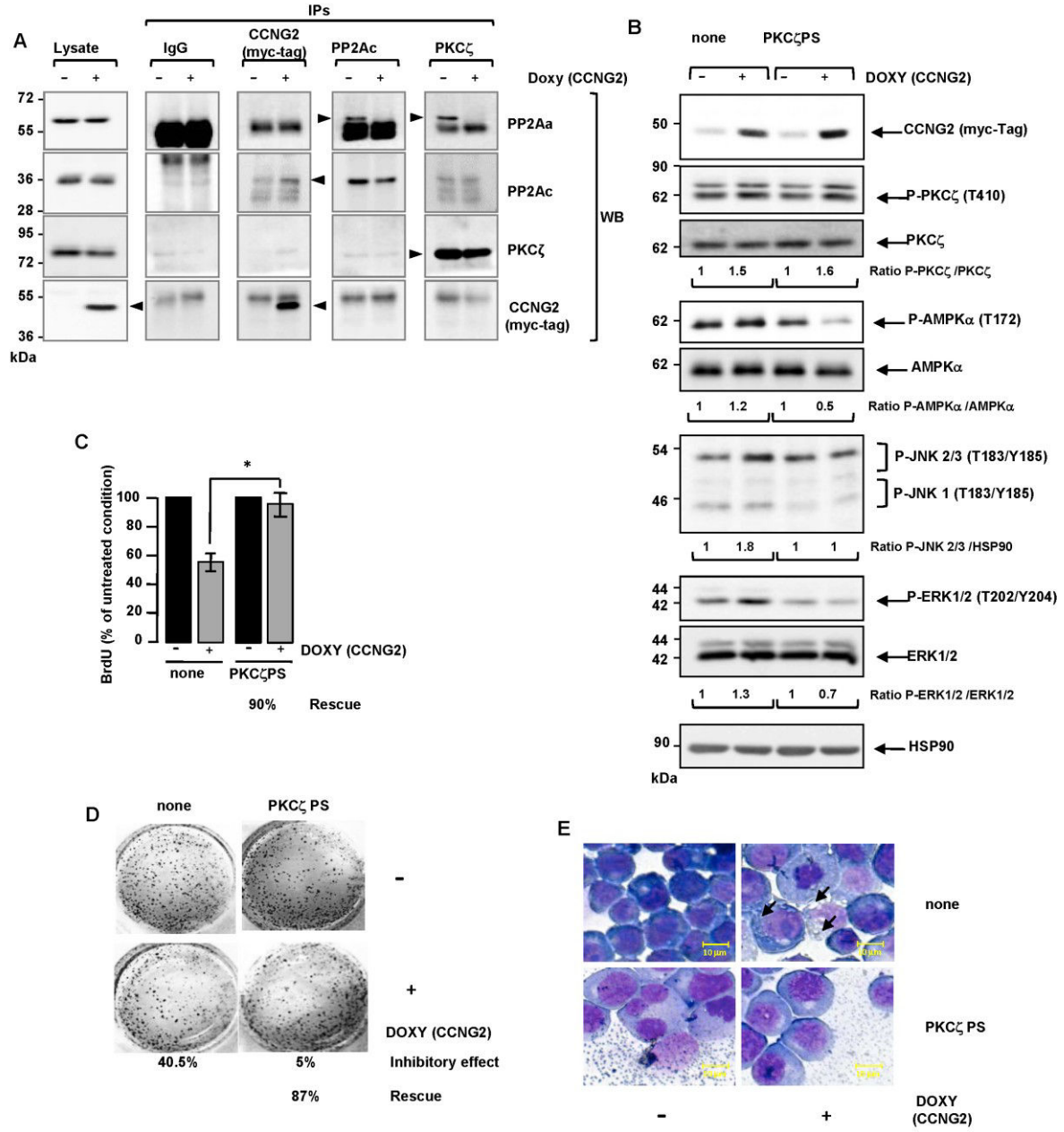


Figure 6

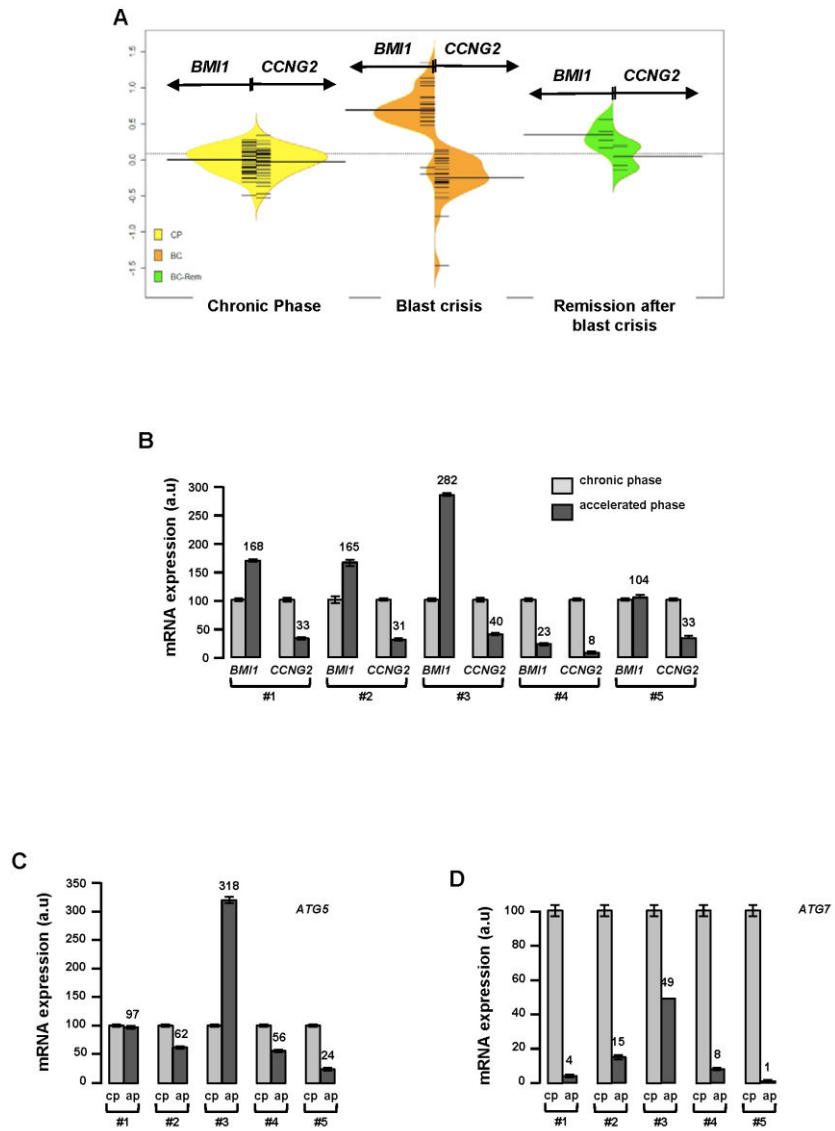
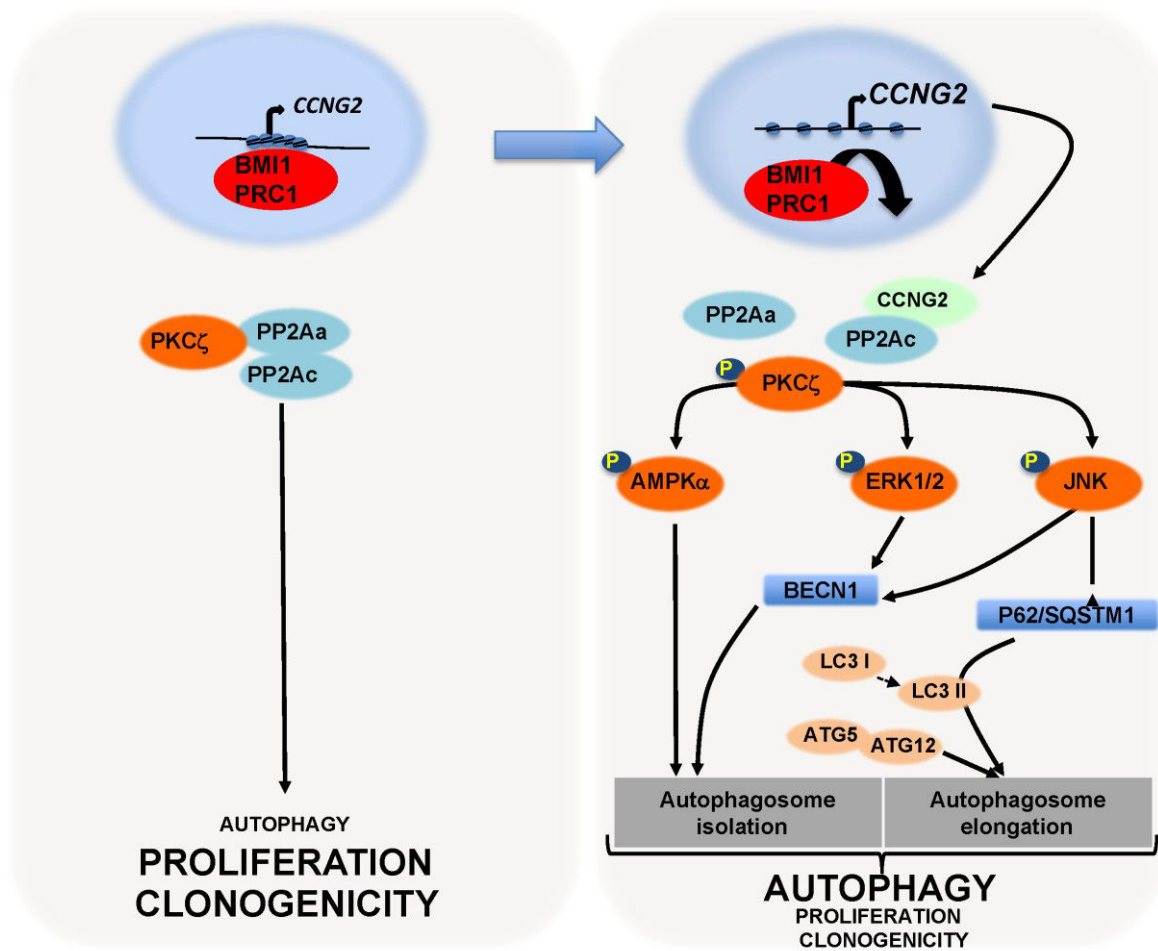


Figure 7



Supplement

Figure S1 - CCNG2 mediates inhibition of proliferation after BMI1 silencing in CML and lymphoma.

A Two distinct shBMI1 (A and B) were transiently transfected in JURL-MK1 and LAMA-84 cell lines. 24 h after transfection, cells were harvested and analyzed by western blotting.

B DNA synthesis of JURL-MK1 and LAMA-84 of (A).

C Heatmap of the unsupervised hierarchical clustering (based on expression microarray data with a row scale using Pearson correlation and complete distance) of *Bmi1* and *Ccng2* genes to show differential expression between *tPten*^{-/-} and WT samples.

D DNA synthesis of KO99 T lymphoma cell line stimulated 3 days with 10 or 50 mM of PRT4165 (PRT).

Error bars represent SEM for 3 biological replicates. * $p < 0.05$; Student's t test.

Figure S2. Expression of siRNA against CCNG2 rescues part of the biological effect lost after BMI1 knockdown.

A A1-K562 cells were stably transfected by a GFP-empty vector (Empty vector) or a GFP-siCCNG2 expressing vector (siCCNG2). After selection, expression of GFP was evaluated by FACS compared to parental clone (A1-K562).

B Western blot analysis of CCNG2 and BMI1 in A1-K562 cells stably expressing an empty vector (CT) or a siRNA against CCNG2 (siCCNG2). Doxy was added when indicated (shBmi1) for 4 days.

C A1-K562 stably transfected by GFP-empty vector (pblu) or GFP-siCCNG2 expressing vector (pblu-siCCNG2) were treated or not by 1mg/ml of Doxy (shBmi1) for 4 days. Part of the cells were then collected and stained with PI and analyzed for DNA content by flow cytometry (AS). The second part of the cells was synchronized by a double thymidine block: Cells were blocked at the G1/S boundary by incubation with 2mM thymidine for 18h. After a 6h recovery in the presence of thymidine (25mM), and 2-deoxycytidine (25mM), cells blocked again with 2mM thymidine for 12h before restart in the presence of thymidine/2-deoxycytidine (25mM). Cells were stopped at indicated time by fixation in 70% ethanol before staining with propidium iodide (1μg/ml, Sigma). Flow cytometry analysis was

performed on a MacsQuant analyzer (Miltenyi). Results are shown for 1 representative experiment that has been repeated 3 times.

Figure S3. Expression of CCNG2 in CML cells promotes autophagic process.

A Western blot analysis of ectopic CCNG2 induction in CCNG2-TO K562 cells after stimulated or not with doxy for 2 days.

B and C CCNG2-TO cells were transfected with either a combination of siRNA against $\alpha 1$ and $\alpha 2$ AMPK (siAMPK), a siRNA against beclin1 (siBECN1) or a control siRNA (siCT). Cells were then stimulated for 3 days with doxy (CCNG2). Expression of CCNG2 and the effect of each siRNA were evaluated by western blotting of their respective target.

D, E, F Biological analyses of CCNG2-TO cells transfected with indicated siRNAs and cultured without/with doxy (CCNG2) for 4 days. Quantification of proliferation clonogenicity (**D**), metabolic activity (**E**) and clonogenicity (**F**).

Error bars represent SEM for 3 biological replicates. * $p < 0.05$; Student's t test.

Figure S4. Activation of AMPK, JNK and ERK pathways in autophagy-induced by CCNG2.

A, B and C CCNG2-TO cells stimulated without/with doxy (CCNG2), were incubated in the presence of signaling inhibitors: dorsomorphine (dorso, 1mM), SP600125 (SP600, 10mM) or U0126 (5mM) for the last 18h. After 3 days, phosphorylation level of the respective targets: P-AMPK α (**A**), P-JNK (**B**) and P-ERK1/2 (**C**) was measured by western blotting.

D and E Quantification of DNA synthesis (**D**) and clonogenicity (**E**) in CCNG2-TO cells stimulated without/with doxy (CCNG2) for 4 days (**D**) or 7 days (**E**) in the presence or not of signaling inhibitors: dorsomorphine (dorso, 1mM), SP600125 (SP600, 10mM) or U0126 (5mM). The extent of the rescue effect induced by inhibitors is indicated.

Figure S1

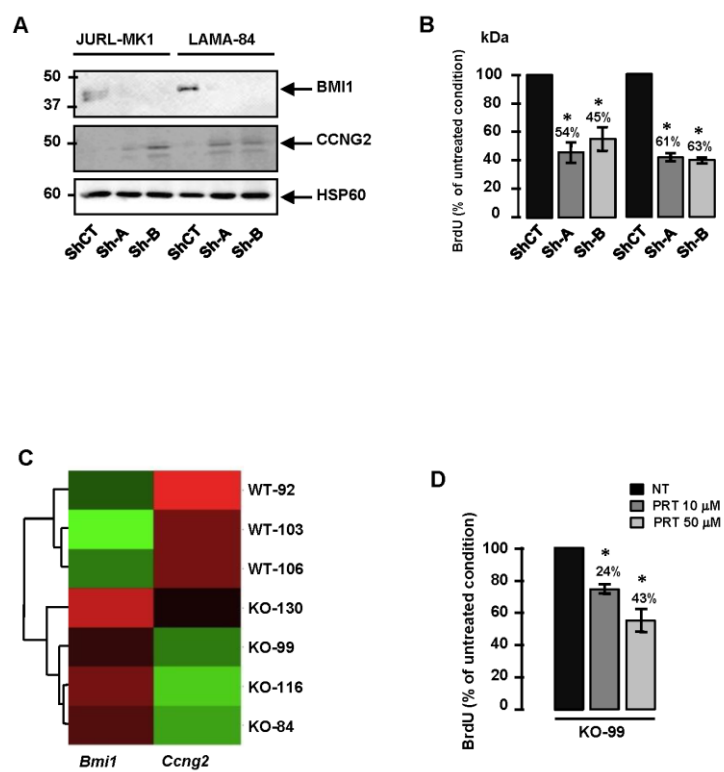


Figure S2

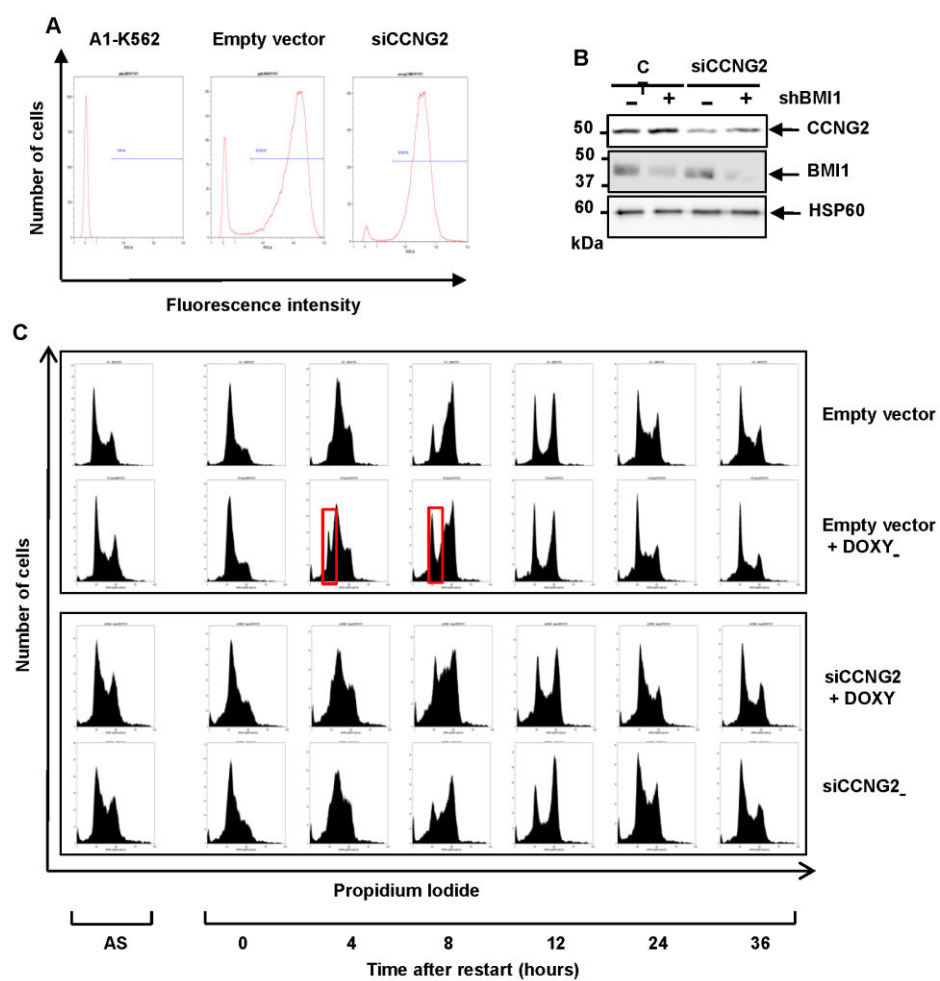


Figure S3

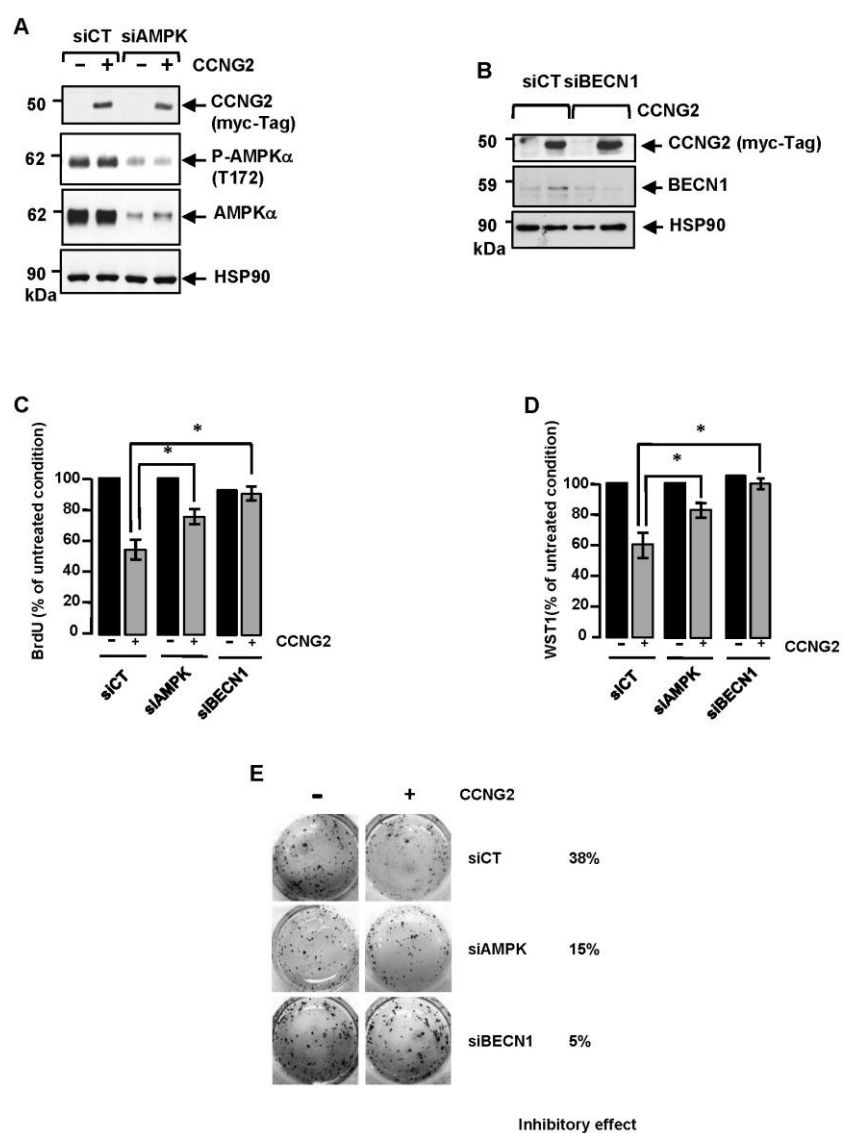
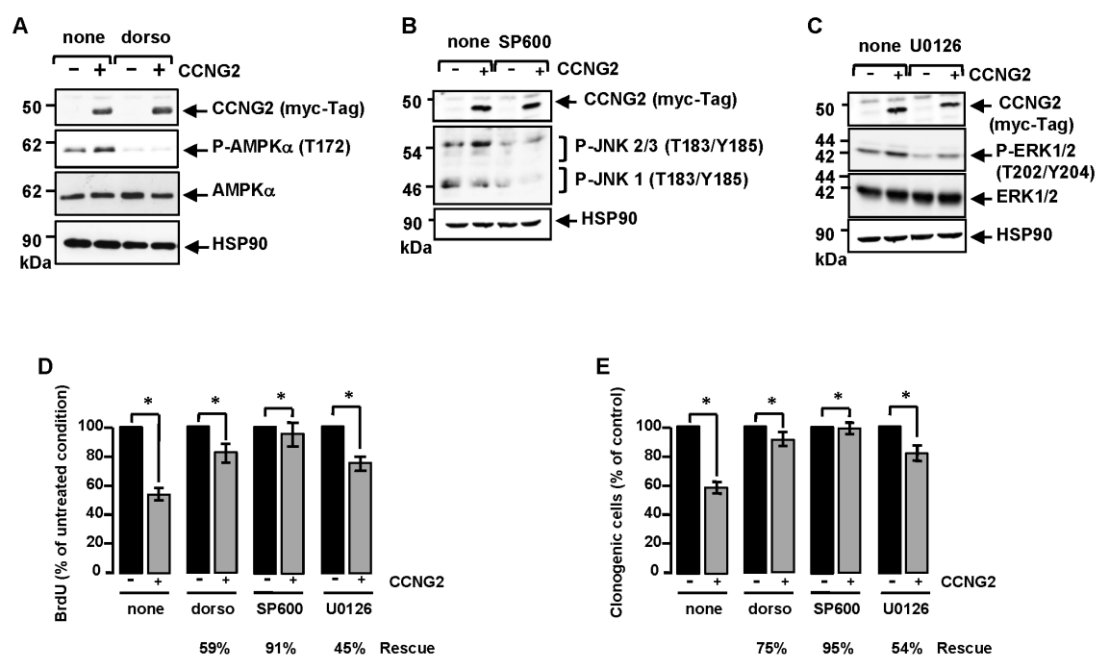


Figure S4



Supplemental Experimental Procedures

Reagent and antibodies. RPMI 1640 media, penicillin, streptomycin, sodium pyruvate and fetal calf serum were purchased from Gibco (Invitrogen). Sodium fluoride, sodium orthovanadate, aprotinin, leupeptin, phenyl-methylsulfonyl fluoride, Triton X-100, thymidine, 2-deoxycytidine, dorsomorphin, bafilomycin, SB202190, SP600125, U0126, phorbol 12-myristate 13-acetate were from Sigma (St Louis, MO, USA). PKCzeta pseudosubstrate myristolyated and doxycyclin from Calbiochem (San Diego, CA, USA). RNA interference-mediated gene knockdown was performed using validated Invitrogen small-interfering RNAs (siRNAs) for beclin 1 (1299001 HSS112741), AMP-activated Protein Kinase subunit alpha1 (1299001 HSS108454) and AMP-activated Protein Kinase subunit alpha 2 (1299001 VHS50583). Oligonucleotides and antibodies used in these studies are listed in the next table.

Oligonucleotides used in this study, Related to ChIP assay in Figure 1.

Primers for ChIP qPCR	
HoxD11 forward primer	5'-CATAAAGACCCGGGTTGAAG-3'
HoxD11 reverse primer	5'-CAGACCCCCAGCACACTTAT-3'
ChIP-A forward primer	5'-GAATACCTTCTCCGCTGCAC-3'
ChIP-A forward primer	5'-GATTCACCCTCGAATCTGGA-3'
ChIP-B forward primer	5'-CTGGGAGGAAGGGTCGGATG-3'
ChIP-B forward primer	5'-GGGCTTCCAAACCTGTCTCG-3'
ChIP-C forward primer	5'-GAGGTTGGTACCATGCGAGT-3'
ChIP-C forward primer	5'-ACCCACGAGCATCTATCTG-3'
ChIP-D forward primer	5'-CTATTGTGCAACACCCCATC-3'
ChIP-D forward primer	5'-CTCTTGGCGTTTCACAAACA-3'

Antibodies used in this study, Related to Experimental Procedures

Targets	Antibodies	Ref.	Society	Use
AMPK	AMPK subunit α	2532	Cell Signaling	WB
	Phospho-AMPK subunit α (Thr172)	2535	Cell Signaling	WB
Atg 5	Atg5	2010	Cell Signaling	WB
Atg 7	Atg7	2630	Cell Signaling	WB
Atg 12	Atg12	2631	Cell Signaling	WB
Beclin-1	Beclin-1	3738	Cell Signaling	WB
Bmi1	Bmi1 (F6)	05-637	Merck Millipore (Upstate)	WB/IF
	Bmi1 (C-20)	sc-8906	Santa Cruz Biotechnology	ChIP
CBX8	CBX8 (pAb)	61237	Active Motif	ChIP
Cyclin G2	Cyclin G1/G2 (FL-249)	sc-851	Santa Cruz Biotechnology	WB/IF
ERK1/2	p44/42 MAP Kinase (137F5)	4695	Cell Signaling	WB
	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	4370	Cell Signaling	WB
HSP60	HSP60 (K-19)	sc-1722	Santa Cruz Biotechnology	WB
HSP90	HSP 90 α / β Antibody (F-8)	sc-13119	Santa Cruz Biotechnology	WB
JNK	JNK (FL)	571	Santa Cruz Biotechnology	WB
	Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	9251	Cell Signaling	WB
LC3B	LC3B (D11)	3868	Cell Signaling	WB
Myc Tag	Myc Tag (4A6)	05-724	Merck Millipore	WB
PKC zeta	PKC zeta (C-20)	sc-216	Santa Cruz Biotechnology	WB/IP
	Phospho-PKC zeta (Thr 410)	sc-12894	Santa Cruz Biotechnology	WB
SQSTM1	SQSTM1 (H-290)	25575	Santa Cruz Biotechnology	WB
Tet repressor	Tet Repressor	AB3541	Merck Millipore	WB
PP2Aa	Protein Phosphatase 2A subunit a (81G5)	2041	Cell Signaling	WB
PP2Ac	Protein Phosphatase 2A subunit c (52F8)	2259	Cell Signaling	WB/IP
WB: Western Blot ; IF: ImmunoFluorescence ; ChIP: Chromatin ImmunoPrecipitation ; IP: ImmunoPrecipitation				

C. Conclusion

Cette étude a permis de révéler un nouveau rôle pour la protéine polycomb BMI1. La régulation d'un processus autophagique délétère pour la cellule leucémique s'ajoute ainsi aux nombreuses capacités oncogéniques de cette protéine. On peut en effet voir dans cette étude que l'extinction de ce répresseur transcriptionnel conduit à la réexpression d'un important gène suppresseur de tumeur, la cycline G2. En interagissant avec le complexe phosphatase PP2A, la cycline G2 permet ainsi l'activation de plusieurs voies autophagiques via la protéine kinase PKC ζ . Cette autophagie a par la suite un effet drastique sur la prolifération des cellules leucémiques. De plus, les niveaux d'expression de *BMI1* et de *CCNG2* sont inversement corrélés au cours de la progression de la phase chronique de la maladie vers la phase aiguë. Ces observations tendent à présenter ce mécanisme de régulation comme pouvant faire partie du processus d'acutisation de la pathologie.

L'altération de la fonction de BMI1 présente donc un fort intérêt thérapeutique pour le traitement de ces pathologies. Malheureusement comme mentionné précédemment BMI1 ne possède pas d'activité enzymatique et il est donc difficile de le cibler directement avec des agents pharmacologiques.

Je me suis attaché dans la suite de mes travaux de thèses à identifier des moyens d'altérer la fonction de BMI1. Deux approches ont pour cela été utilisées, en amont et en aval de ce polycomb :

- L'identification des voies de signalisation responsables de la surexpression de BMI1 dans ces cellules afin de les cibler pharmacologiquement.
- La recherche de molécules capables d'induire la réexpression de gènes réprimés par BMI1 et ainsi mimer les effets de son extinction mis en évidence précédemment.

VII. Objectif 2 : Identification de la voie de signalisation régulant l'expression de BMI1 dans les cellules de LMC.

A. Présentation de l'étude et résumé

Bien que BMI1 soit retrouvé surexprimé dans de nombreux cancers peu de choses sont connues sur les voies de signalisation ou les facteurs qui en sont responsables. La surexpression de BMI1 peut parfois être causée par une altération chromosomique au niveau du chromosome 10 qui porte ce gène. C'est le cas de certaines leucémies lymphoïdes chroniques présentant, en lien avec la progression tumorale, la translocation t(10 ;22)(p12q32) qui consiste en un réarrangement entre *IGH* et *BMII*. Des lésions au niveau 10p12 associées à un gain de locus *BMII* ont également été retrouvées chez des patients atteints de lymphome à cellules du manteau (Rouhigharabaei et al., 2013). Plusieurs facteurs de transcription peuvent être responsables de la surexpression de BMI1 dans le contexte néoplasique. On peut par exemple citer SP1 et cMYC dans le cas du carcinome du nasopharynx (Wang et al., 2013), SALL4 dans le cas de la leucémie aiguë promyéocytaire ou myéloblastique (Yang et al., 2007) et enfin cMYB dans des modèles de LAL-B exprimant la protéine de fusion p190^{BCR-ABL} (Waldron et al., 2012). Dans le cas de la LMC, il a été montré que le niveau d'expression de BMI1 augmente avec la progression vers les phases les plus avancées de la maladie. En outre, l'expression ectopique de BCR-ABL dans la lignée cellulaire HEK293 est suffisante pour induire une forte activité du promoteur de *BMII* (Bhattacharyya et al., 2009).

BCR-ABL, de par son activité kinase constitutive, active de nombreuses voies de signalisation dans les cellules de LMC. Parmi les principales kinases régulées par BCR-ABL, on peut retrouver JNK (Raitano et al., 1995), la PI3K (Skorski et al., 1995), la voie RAS/MEK/ERK (Cortez et al., 1997), certaines kinases de la famille SRC (LYN, HCK et FYN) (Danhauser-Riedl et al., 1996) ainsi que des membres de la famille des PKC (β , ι , δ) (Gustafson et al., 2004; Kin et al., 2001; Xenaki et al., 2004). La voie JNK peut avoir des effets anti-tumoraux pour les cellules de LMC en présence de certaines molécules comme le resvératrol ou les céramides. Son activation par BCR-ABL semble en revanche participer au mécanisme de leucémogénèse, l'un des rôles de BMI1. L'activation de la voie PI3K/AKT joue un rôle important dans le métabolisme, l'apoptose et la prolifération ce qui est le cas de BMI1. La voie RAS/MEK/ERK est impliquée dans de nombreux processus cellulaires parmi

lesquels l'activation de facteurs de transcription. c-MYC peut être activé par phosphorylation via ERK or ce facteur de transcription est capable de réguler le promoteur de BMI1. Les kinases de la famille SRC sont fortement impliquées dans les cascades de signalisation en aval ainsi qu'en amont de BCR-ABL, des membres de cette famille pouvant phosphoryler cet oncogène.

Les PKC sont regroupées en trois groupes distincts selon leur mode d'activation. Il y a les PKC dites « conventionnelles » (α , β_I , β_{II} et γ), les « nouvelles » (δ , ϵ , η et θ) et enfin les « atypiques » (μ/ζ et ι/λ). Toutes ces isoformes n'ont pas les mêmes fonctions et si certaines d'entre elles comme PKC α , β , ι et δ peuvent être retrouvées surexprimées dans les cellules BCR-ABL ce n'est pas le cas des autres. L'inhibition de ces voies semble perturber l'initiation de la pathologie, ralentir la prolifération cellulaire et peut induire de l'apoptose.

Chacune de ces voies de signalisation régule des processus pouvant requérir l'expression de BMI1, elles sont donc autant de candidats potentiels pour sa régulation.

Afin d'identifier les voies de signalisation impliquées dans la régulation de BMI1 dans le contexte de la LMC, nous avons utilisé une approche pharmacologique. Nous avons mesuré l'activité du promoteur *BMI1* grâce à un gène rapporteur luciférase en présence d'inhibiteurs visant chacune des voies précédemment citées (Figure 13). Les kinases présentant les résultats les plus pertinents ont ensuite été étudiées plus en détail.

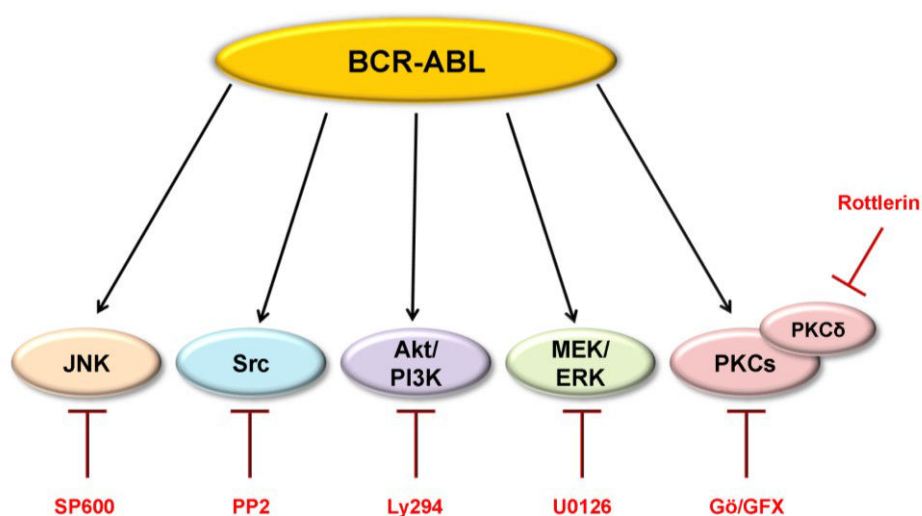


Figure 13. Approche expérimentale. Ce schéma représente les différentes voies de signalisation régulées par l'oncogène BCR-ABL dans la LMC. À chaque kinase est associé le nom de la molécule utilisée pour bloquer son activité afin

d'identifier la ou les voies de signalisation régulant l'expression de BMI1. Nom complet des molécules : SP600125, PP2, Ly294002, U0126, G66983, GF 109203X.

Résumé de l'étude :

BMI1 est un répresseur transcriptionnel de la famille des polycombs que l'on retrouve surexprimé dans de nombreux types de cancers. Le rôle de cet oncogène est de mieux en mieux caractérisé : il participe à la transformation tumorale, à la régulation de la prolifération cellulaire, de l'auto-renouvellement des CSC et est impliqué dans plusieurs mécanismes de résistances aux traitements. En revanche, peu de choses sont connues sur sa régulation dans les cellules cancéreuses. Dans cette étude nous démontrons en utilisant une technique de gène rapporteur luciférase que le promoteur de *BMI1* est fortement transcrit en présence de l'oncogène BCR-ABL, à la fois dans les cellules HEK et dans des lignées de LMC. L'inhibition de l'activité kinase de BCR-ABL avec l'imatinib ou son extinction par shRNA a pu mettre en évidence son rôle dans la régulation de BMI1 au sein de la lignée cellulaire de LMC K562. Une approche pharmacologique visant les principales voies de signalisation activées par BCR-ABL dans ces cellules a permis d'identifier 2 voies impliquées dans la régulation de BMI1 : les kinases de la famille Src et la PKC δ appartenant au groupe des nouvelles PKC. La transfection d'un mutant dominant inactif de PKC δ est suffisant pour réduire de façon importante le niveau protéique de BMI1 et à l'inverse un mutant constitutif actif en stimule l'expression. Ces mutants affectent de façon significative la prolifération cellulaire, le métabolisme mitochondrial ainsi que le potentiel clonogénique des cellules leucémiques qui tous trois sont connus pour être régulés par BMI1. Ces résultats proposent un nouveau rôle oncogénique pour PKC δ qui en stimulant l'expression de BMI1 participerait ainsi à l'acquisition ou au maintien de processus cancéreux.

Mots-clés : BMI1 ; PKC δ ; BCR-ABL ; LMC.

B. Matériels et méthodes

Culture cellulaire. La lignée humaine de LMC K562 et la lignée humaine HEK-293 (ATCC) ont été cultivées à 37°C et sous 5% CO₂ dans respectivement du milieu RMPI 1640 et du milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau foetal, 50U/ml de streptomycine/pénicilline et 1mM de pyruvate de sodium. Les cellules K562 (Tet-K562) transfectées stablement avec le vecteur pCDNA6-TR (Invitrogen) permettant l'expression du répresseur tétracycline dépendant ont été précédemment décrites (Colosetti et al., 2009). Les cellules exprimant de façon inductible un shRNA dirigé contre BCR-ABL nous ont été fournies par l'équipe du Dr Auberger P. (Puissant et al., 2012).

Réactifs et anticorps. Les inhibiteurs SP600125, PP2, Ly294002, U0126, Gö6983, GF 109203X et SB202190 proviennent de Calbiochem. L'imatinib provient d'Enzo Life Sciences. Les anticorps anti-BMI1 (05-637) et anti-MycTag (05-724) proviennent d'Upstate Millipore ; anti-P-ABL (2861), anti-BCR (3902), anti-PKC δ (2058), anti-P-Src family (2101) proviennent de Cell signaling et l'anti-HSP60 (Sc-1722) de Santa-Cruz Biotechnologies. Les siRNA dirigés contre PKC δ (VHS41574), PKC α (VHS41564) et PKC β (HSS108493) proviennent d'Invitrogen Life Technologies.

Transfection siRNA. Les siRNA ont été transfectés dans les cellules K562 en utilisant le réactif Lipofectamine-RNAi MAX (Life Technologies) comme décrit dans le précédent chapitre.

Transfection HEK293. Les cellules HEK293 ont été transfectées à l'aide du réactif Lipofectamine 2000 selon le protocole fourni.

Mesure de l'activité du promoteur. 36 à 48h après transfection, les cellules sont centrifugées 5 min à 2000 rpm pour éliminer le surnageant. Le culot est lavé avec du PBS. Les cellules sont ensuite lysées dans 500 μ l de tampon Reporter Lysis Buffer (Promega) par un cycle de congélation (azote liquide) – décongélation (1 min à 37°C). Les lysats sont centrifugés 15 min à 4°C et 12 000 rpm. Les surnageants protéiques sont recueillis et déposés (60 μ l/puits) dans des plaques. L'activité luciférase est mesurée 30 secondes après injection de 50 μ l de tampon contenant de la luciférine (Luciferase Assay Reagent, Promega) par un luminomètre (LBCentro, Berthold). La construction porteuse du gène de la luciférase sous

contrôle du promoteur de Bmi-1 nous a été fournie par l'équipe du Dr Guo W.J. (Guo et al., 2007).

Etablissement de lignées stables. Les cellules K562 exprimant le pCDNA6-TR stablement sont transfectées par électroporation avec la technique Amaxa (Lonza). Environ 10^6 cellules sont centrifugées puis resuspendues dans 100 μ l de réactif V additionné du volume correspondant à 2 μ g de plasmide. La suspension obtenue est soumise à électroporation (programme T-14). Après 24h les cellules transfectées sont mises sous pression de sélection avec 100 μ g/ml de Zéocine (Invitrogen). Les plasmides (pCDNA4-TO) exprimant les différents mutants PKC sous le contrôle d'un promoteur TetOn nous ont été fournis par l'équipe du Dr. Mari B. (Louis et al., 2005).

Western-Blot, test de la clonogénicité, de la prolifération et du métabolisme mitochondrial. Voir étude précédente.

C. Résultats

BCR-ABL régule transcriptionnellement l'expression de BMI1 dans les cellules K562.

Afin de vérifier que l'oncogène BCR-ABL est bien à la source de la surexpression de BMI1 retrouvée chez les patients atteints de LMC, des cellules K562 (une lignée humaine de LMC) ont été traitées avec son inhibiteur, l'imatinib (IMA). Le traitement à l'imatinib inhibe la phosphorylation à la fois de BCR-ABL et d'ABL (**Figure 14A**). Le niveau protéique de BMI1 chute dès 4h et descend jusqu'à 50% de son niveau d'origine. Une importante réduction du niveau protéique de BMI1 a également été retrouvée après l'extinction de la protéine BCR-ABL par un shRNA inductible à la doxycycline (DOXY) dans des cellules K562-shBCR-ABL/TO (**Figure 14B**). Ces mêmes cellules ont été transfectées de façon transitoire avec un vecteur portant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur de *BMI1* (prom*BMI1*:luc). L'activité du promoteur de *BMI1* est réduite d'environ 40% lors de l'extinction de BCR-ABL induite par la doxycycline (**Figure 14C**). Le promoteur retrouve une forte activité lorsque les cellules K562-shBCR-ABL/TO sont co-transfectées avec un vecteur surexprimant BCR-ABL contournant ainsi l'effet du shRNA.

Afin d'identifier les voies de signalisation en aval de BCR-ABL responsable de la régulation transcriptionnelle de *BMI1* nous avons utilisé le modèle reconstitué suivant. Des cellules HEK-293 ont été co-transfectées avec le vecteur *promBMI1:luc* et un vecteur surexprimant BCR-ABL. Comme cela a déjà été montré (Bhattacharyya et al., 2009), l'expression ectopique de BCR-ABL est nécessaire à une forte activation transcriptionnelle de *BMI1* dans des cellules HEK-293 (Figure 14D). Deux jours après leur transfection ces cellules ont été traitées 12 heures avec des inhibiteurs des principales kinases régulées par BCR-ABL. Aucune altération significative de l'activité du promoteur de *BMI1* n'a pu être observée avec les inhibiteurs des protéines MEK (U0126), PI3K (Ly294002), p38MAPK (SB202190) et JNK (SP600125). Une forte inhibition a été enregistrée avec l'inhibiteur des kinases de la famille SRC (PP2). Les mêmes résultats ont été obtenus avec le GF109203X qui inhibe à la fois les isoformes conventionnelles et nouvelles des PKC contrairement au Gö6983 qui n'inhibe que le groupe des PKC conventionnelles et qui n'a pas eu d'effet sur l'activité luciférase enregistrée. Enfin, l'inhibition plus spécifiquement de la PKC δ , une PKC nouvelle, avec son inhibiteur la rottlerine a un fort impact sur l'activité transcriptionnelle du promoteur de *BMI1* en inhibant totalement l'action de BCR-ABL (Figure 14D).

Les kinases de la famille SRC et la PKC δ participent à la régulation de l'expression de *BMI1* dans les cellules de LMC.

Des cellules K562 ont été transfectées avec le vecteur *promBMI1:luc* puis traitées avec des inhibiteurs des kinases SRC et PKC δ . L'inhibition pharmacologique des kinases SRC (PP2) et de la PKC δ (rottlerine) réduit l'activité transcriptionnelle du promoteur de *BMI1* dans les cellules K562 à un niveau proche de celui induit par l'inhibition de BCR-ABL (IMA) (Figure 15A). Cette inhibition transcriptionnelle est associée à une forte diminution du niveau protéique de *BMI1* et pas de *RING1B* une protéine polycomb appartenant au même complexe, dans les cellules K562 traitées au PP2 (Figure 15B) ou à la rottlerine (Figure 15C). La spécificité de la rottlerine pour l'inhibition de la protéine PKC δ étant fortement controversée (Zhao et al., 2002a), d'autres moyens ont été utilisés pour démontrer que la protéine PKC δ régulait *BMI1*. Des cellules K562 ont été co-transfectées avec le vecteur *promBMI1:luc* et des siRNA dirigés contre différentes PKC ou encore des vecteurs portant des formes mutées dominantes négatives de ces kinases. L'extinction par siRNA de la PKC δ , mais pas des PKC α et PKC β appartenant à la sous-famille des PKC conventionnelles, réduit l'activité transcriptionnelle du promoteur *BMI1* (Figure 15D). La co-transfection avec une forme dominante négative de la PKC δ (PKC δ -DN) inhibe également l'activité luciférase

contrairement au mutant dominant négatif de la PKC θ qui appartient pourtant également au groupe des PKC nouvelles. L'extinction de la PKC δ via la transfection d'un siRNA spécifique permet une réduction du niveau protéique de BMI1 d'environ 80% à la dose la plus forte (Figure 15E).

Les formes mutantes PKC δ -DN et PKC-CA affectent la régulation de BMI1 et des processus cellulaires qui y sont associés.

Pour évaluer si la PKC δ était capable de réguler les processus associés à la surexpression de BMI1 des lignées stables de cellules K562 exprimant de façon inductibles les formes mutées de différentes PKC ont été établies. L'induction de l'expression de ces protéines après traitements à la doxycycline a été évaluée par western blot. L'expression ectopique des PKC α -DN (conventionnelle), PKC ϵ -DN (nouvelle) et PKC δ -DN (nouvelle) est correctement induite par l'ajout de doxycycline. Seule l'expression de la PKC δ -DN a un effet sur le niveau protéique de BMI1 en le réduisant fortement (Figure 16A). Bien qu'appartenant toutes deux au même groupe des PKC nouvelles, entre les deux isoformes PKC ϵ -CA et PKC δ -CA, seul le mutant constitutif actif de PKC δ permet une augmentation significative du niveau protéique de BMI1 dans les cellules de lignées de LMC (Figure 16B). Notre précédente étude a montré que BMI1 était impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire, du métabolisme mitochondrial ainsi que du potentiel clonogénique des cellules de LMC. Ces différents paramètres ont donc été évalués dans les cellules exprimant les formes mutantes de la PKC. L'expression de la forme constitutive active de la PKC δ stimule fortement la synthèse d'ADN en lien avec la prolifération cellulaire ainsi que le métabolisme mitochondrial comme le ferait une augmentation de l'expression de BMI1 (Figure 16C et D). À l'inverse, la forme PKC δ -DN quand elle est exprimée limite de manière significative ces deux paramètres, de manière similaire à ce que donnerait une extinction de la protéine BMI1. Alors que la forme constitutive active de la PKC ϵ n'a pas d'effet sur le potentiel clonogénique de nos cellules comme le montre l'expérience de formation de colonies en milieu semi-solide (Figure 16E) l'induction du mutant PKC δ -CA via la doxycycline augmente considérablement le nombre de colonies formées.

D. Figures et légendes

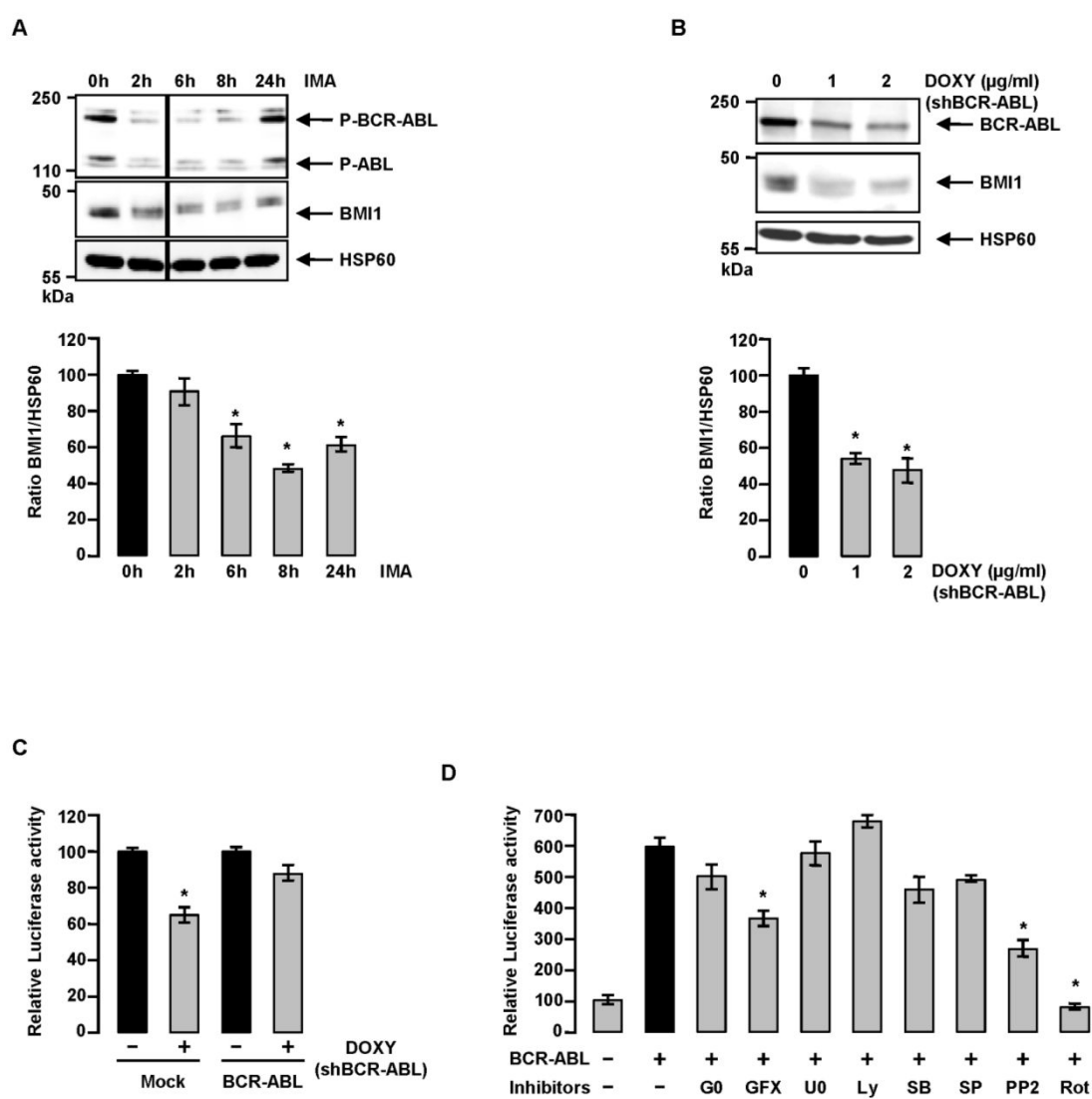


Figure 14. BCR-ABL régule transcriptionnellement BMI1 dans la lignée cellulaire de LMC K562.

Figure 14 : BCR-ABL régule transcriptionnellement BMI1 dans la lignée cellulaire de LMC K562.

- (A)** Des cellules K562 ont été traitées durant le temps indiqué avec 1 μ M d'imatinib (IMA), l'inhibiteur de BCR-ABL. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par western-blot, une partie non pertinente du blot a été retirée et la coupure symbolisée par un trait noir. Le ratio BMI1/HSP60 de trois expériences différentes est présenté sous le blot.
- (B)** Des cellules K562 shBCR-ABL/TO ont été traitées pendant 4 jours avec de la doxycycline (DOXY) à la dose indiquée. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par western-blot. Le ratio BMI1/HSP60 de trois expériences différentes est présenté sous le blot.
- (C)** Après 2 jours de traitement avec 1 μ g/ml de DOXY, des cellules K562 shBCR-ABL/TO ont été co-transfectées avec le vecteur prom*BMI1*:luc en association avec un vecteur vide (Mock) ou surexprimant BCR-ABL (BCR-ABL). 2 jours plus tard les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été mesurée.
- (D)** Des cellules HEK-293 ont été co-transfectées avec le vecteur prom*BMI1*:luc et un vecteur surexprimant BCR-ABL. 48h plus tard les cellules ont été traitées sur la nuit avec du Gö6983 (1 μ M), GF109203X (2.5 μ M), U0126 (1 μ M), Ly294002 (1 μ M), SB202190 (5 μ M), SP600125 (5 μ M), PP2 (5 μ M) ou de la rottlerine (1 μ M). Les cellules ont ensuite été lysées et l'activité luciférase a été mesurée.

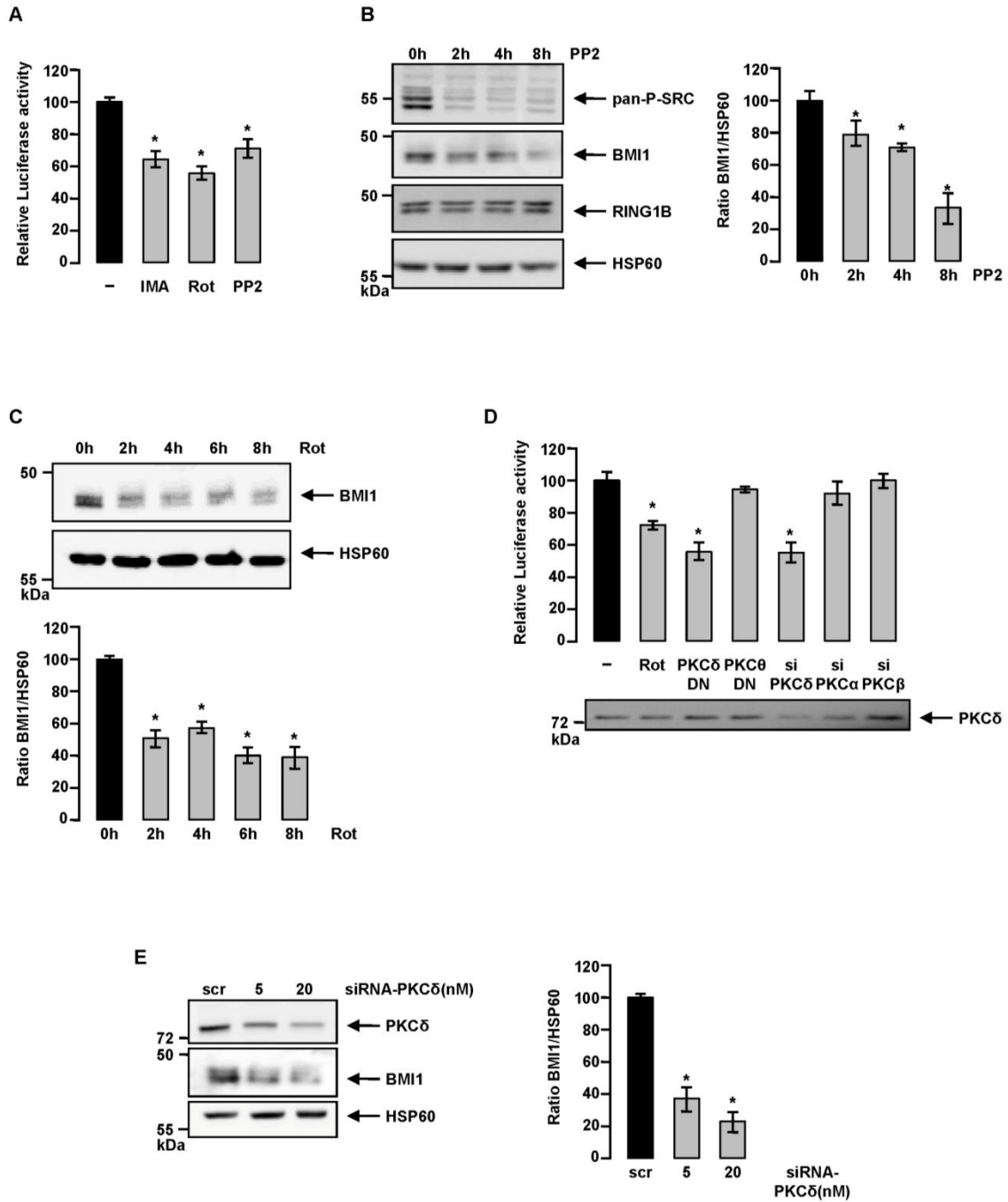


Figure 15. Les kinases de la famille SRC et la PKC δ participent à la régulation de l'expression de BMI1 dans les cellules de LMC.

Figure 15 : Les kinases de la famille SRC et la PKC δ participent à la régulation de l'expression de BMI1 dans les cellules de LMC.

(A) Des cellules K562 ont été transfectées de façon transitoire avec le vecteur prom*BMI1*:luc. 48h plus tard les cellules ont été traitées sur la nuit avec de l'imatinib (1 μ M), de la rottlerine (1 μ M) ou du PP2 (5 μ M). Les cellules ont ensuite été lysées et l'activité luciférase a été mesurée.

(B, C) Des cellules K562 ont été traitées durant le temps indiqué avec de la rottlerine (1 μ M) (B) ou du PP2 (5 μ M) (C). Puis les lysats protéiques ont été analysés par western-blot. Le ratio BMI1/HSP60 de trois expériences différentes est présenté.

(D) Des cellules K562 ont été co-transfectées avec le vecteur prom*BMI1*:luc et des siRNA dirigés contre PKC δ , α ou β ou avec des vecteurs exprimant des mutants dominants négatifs de PKC δ (PKC δ -DN) ou PKC θ (PKC θ -DN). Au bout de 48h les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été mesurée. L'activité luciférase du vecteur prom*BMI1*:luc seul est ici représenté en noir.

(E) Des cellules K562 ont été transfectées avec un siRNA spécifique de PKC δ aux concentrations indiquées. Puis les lysats protéiques ont été analysés par western-blot. Le ratio BMI1/HSP60 de trois expériences différentes est présenté.

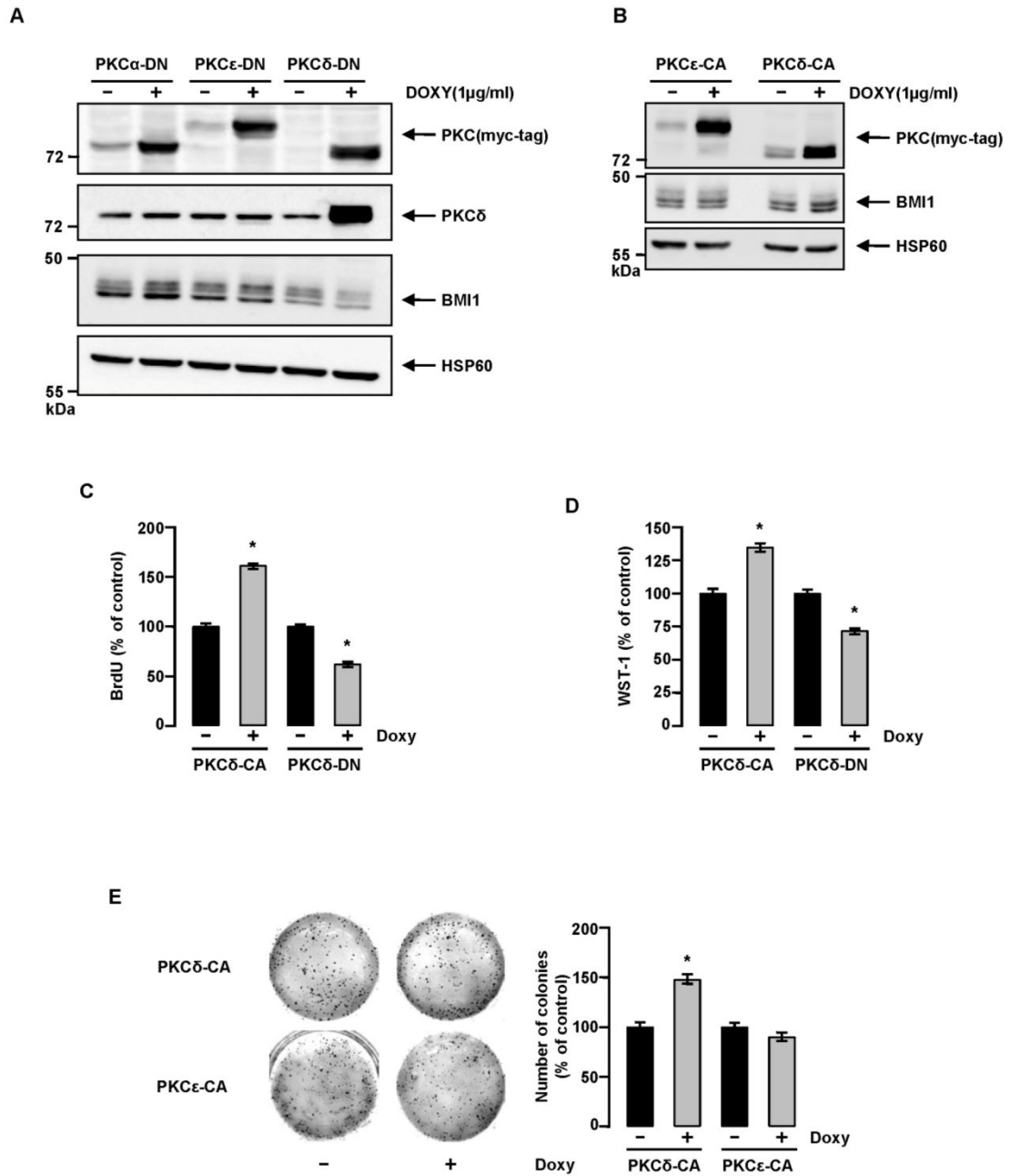


Figure 16. Les formes mutantes PKCδ-DN et PKC-CA affectent la régulation de BMI1 et des processus cellulaires qui y sont associés.

Figure 16 : Les formes mutantes PKC δ -DN et PKC-CA affectent la régulation de BMI1 et des processus cellulaires qui y sont associés.

(A, B) Des cellules K562 ont été transfectées de façon stable avec des vecteurs inducibles à la doxycycline codant pour les formes dominantes négatives (DN) des PKC α , δ et ϵ (A) ou pour les formes constitutives actives de PKC δ et ϵ (B). Après sélection à la zéocine, les cellules transfectées ont été traitées 48h avec 1 μ g/ml de doxycycline, puis les lysats protéiques ont été analysés par western-blot.

(C) La synthèse d'ADN des cellules exprimant de façon inducible PKC δ -CA ou -DN a été évaluée par un test Elisa d'incorporation de BrdU après 4 jours de culture en présence ou non de doxycycline.

(D) Le métabolisme mitochondrial des mêmes cellules que (C) a été évalué par un essai WST-1.

(E) Des cellules K562 exprimant de façon inducible un mutant PKC δ -CA ou PKC ϵ -CA ont été mises en cultures pendant 7 jours en milieu semi-solide de méthylcellulose en triplicat à une densité de 6.10^3 cellules/ml en présence ou non de doxycycline. Leur capacité à former des colonies a été mesurée et est représentée à droite.

E. Brève discussion

Cette étude, bien qu'encore incomplète, nous a permis de mettre en évidence la régulation transcriptionnelle de BMI1 par BCR-ABL dans une lignée de LMC. Il a été plusieurs fois proposé que BMI1 pouvait participer à la transformation leucémique des cellules CD34⁺ par BCR-ABL (Rizo et al., 2010). Le fait que BCR-ABL puisse réguler directement BMI1 dans un contexte leucémique renforce la possibilité que BMI1 participe aux phases précoces de l'initiation de la pathologie. Une approche pharmacologique nous a permis d'identifier des kinases en aval de BCR-ABL qui pouvaient être responsables de la surexpression de BMI1 : des kinases de la famille Src et la PKC δ . Pour compléter ces observations, il serait intéressant de déterminer quelles kinases de la famille SRC sont plus spécifiquement impliquées dans la régulation de BMI1, certaines étant d'ailleurs capables de réguler directement par phosphorylation la PKC δ . C'est ainsi le cas de LYN et HCK qui activent la PKC δ en la phosphorylant sur le résidu tyrosine Y311 dans les monocytes (Xue et al., 2010). La PKC δ peut également phosphoryler en retour les kinases LYN et Src avec lesquelles elle interagit dans les leucémies basophiles (Song et al., 1998). Il apparaît donc ainsi difficile d'identifier la hiérarchie de ces kinases et d'en déduire les cibles potentielles responsables de la régulation de BMI1. La PKC δ peut avoir des rôles très différents selon le type cellulaire ainsi que le contexte environnemental. Elle est ainsi considérée comme un suppresseur de tumeur car elle peut avoir des effets pro-apoptotiques en réponse aux dommages à l'ADN ou après son clivage par la caspase 3 qui aboutit à la libération d'un fragment catalytiquement actif de cette PKC (Basu, 2003; Liu et al., 2007). Dans le cas de la LMC, le rôle de la PKC δ est plus ambigu, il semblerait qu'elle puisse participer aux stades les plus précoces de l'initiation de la pathologie par BCR-ABL (Kin et al., 2001) mais elle a également été montrée être en partie responsable des effets anti-tumoraux de l'interféron α sur les cellules de LMC (Kaur et al., 2005). Il est tout de même à noter que cette dernière étude a été réalisée sur une lignée de LMC (KT-1) où PKC δ est très faiblement active en conditions basales mais que ce n'était plus du tout le cas quand les cellules présentent une forte activité basale de PKC δ comme dans la lignée K562. Tout comme nous l'avons montré pour BMI1, il semblerait que l'inhibition de la PKC δ par ARN interférence puisse induire une autophagie délétère dans certaines cellules cancéreuses, par exemple le cancer du pancréas, en permettant la réexpression de la protéine BECLIN1 (Ozpolat et al., 2007). Il serait intéressant de vérifier si dans notre modèle l'inhibition de la PKC δ pourrait induire l'autophagie en plus de la

répression de BMI1. Une récente étude a présenté l'élaboration de nouveaux inhibiteurs de PKC δ qui s'avèrent bien plus spécifiques de cette kinase que la rottlerine (Chen et al., 2014b). Dans cette même étude, en inhibant l'activité de la PKC δ , ces molécules induisent un ralentissement de la prolifération cellulaire ainsi que la mort cellulaire de CSC de plusieurs types de cancer (prostate, pancréas, sein et mélanomes). Seuls des cancers solides ont été testés mais il est possible que ces inhibiteurs aient le même effet dans les leucémies et lymphomes. Cet effet pourrait d'ailleurs dépendre de la régulation de BMI1 par la PKC δ et permettrait ainsi en agissant en amont de l'expression de BMI1 d'en bloquer la fonction dans le maintien des CSC. De telles molécules présentent un fort intérêt thérapeutique dans le contexte du ciblage des CSL de LMC afin de limiter les cas de rechutes après arrêt du traitement.

VIII. Objectif 3 : Recherche de molécules pouvant induire la réexpression de gènes cibles de BMI1 dans les cellules de LMC.

A. Présentation de l'étude et résumé

Notre précédente étude portant sur le rôle de BMI1 dans les cellules de LMC nous a permis de mettre en évidence l'intérêt thérapeutique que peut avoir son extinction dans cette pathologie. En effet, BMI1 est un répresseur transcriptionnel au fort potentiel oncogénique et on retrouve parmi les gènes qu'il réprime plusieurs suppresseurs de tumeur comme PTEN, le locus CDKN2A ou, comme nous l'avons démontré, la cycline G2. L'extinction de BMI1 par ARN interférence est retrouvée délétère dans un grand nombre de cancers mais la possibilité d'induire une telle réponse avec des moyens pharmacologiques est très limitée. Dans le précédent chapitre de ce manuscrit, nous avons pu voir comment affecter BMI1 en bloquant en amont les kinases responsables de sa surexpression ; dans cette étude nous avons cherché à agir « en aval » de BMI1 en utilisant une molécule capable d'induire la réexpression des gènes qu'il réprime dans les cellules leucémiques. Nous avons pour cela utilisé l'analyse transcriptomique comparant des cellules leucémiques K562 avant (BMI1^{high}) et après extinction de BMI1 par shRNA (BMI1^{low}). Un profil transcriptomique listant les gènes différemment exprimés entre ces deux conditions a ainsi été généré. Par la suite, une approche bioinformatique basée sur la base de données Connectivity Map (cmap) développée par le Broad Institute en 2006 (www.broad.mit.edu/cmap) nous a permis d'identifier des molécules capables de générer ce profil dans des cellules leucémiques.

Le cmap est une base de données regroupant les profils transcriptomiques induits par diverses molécules sur des lignées humaines de différents cancers : leucémie (HL60), cancer du sein (MCF7), mélanome (SKMEL5) et cancer de la prostate (PC3). Chaque molécule, plusieurs centaines à ce jour, est testée sur ces lignées, généralement à une dose de 10µM pendant 6h. Par la suite une analyse transcriptomique révélant la liste des gènes modulés positivement ou négativement est effectuée. Cette base de données a deux vocations. La première est de pouvoir trouver une liste des gènes potentiellement impliqués dans les effets que l'on peut observer après traitement avec l'une de ces molécules. La deuxième façon

d'utiliser le cmap est à l'inverse de partir d'un profil transcriptomique précis, par exemple les gènes différemment exprimés entre deux phénotypes : sain/malade, sensible/résistant, souche/différenciée... En comparant ce profil à ceux de la base de données, on peut obtenir une liste de molécules potentiellement capables de mimer ce profil ou au contraire de le réverser (Figure 17).

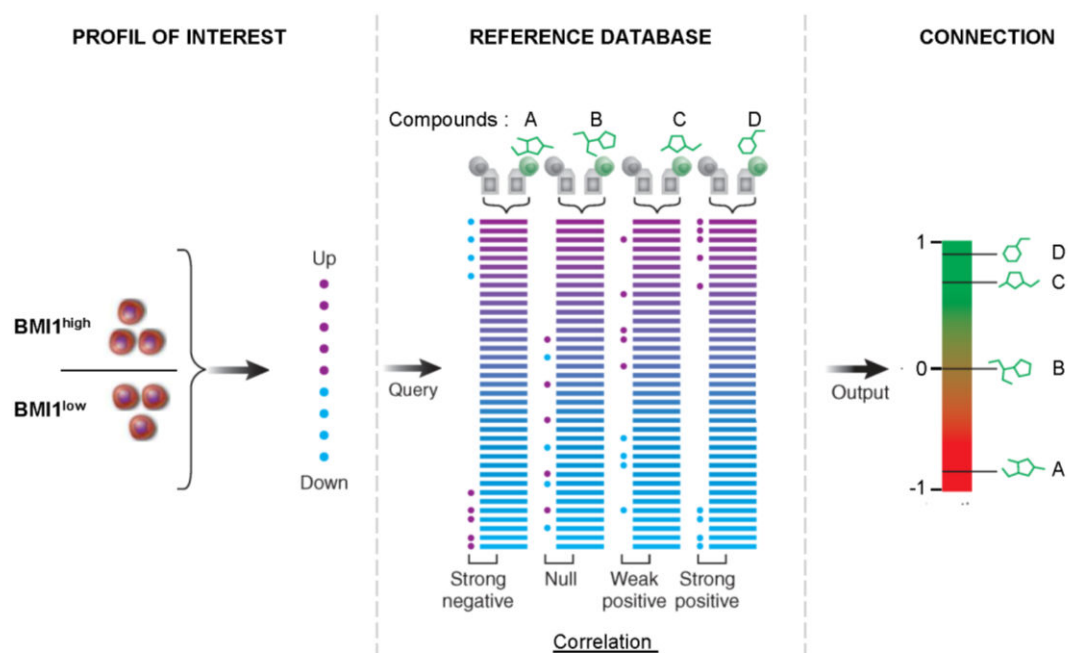


Figure 17. Mode de fonctionnement du Connectivity Map. La partie gauche du schéma représente le profil transcriptomique d'intérêt, ici les gènes modulés lors de l'extinction de BMI1 (BMI1^{high} vs BMI1^{low}) dans des cellules K562. Les ronds représentent chacun un gène : violet lorsqu'il est up-régulé et bleu lorsqu'il est down-régulé. Le centre du schéma représente la comparaison de notre profil d'intérêt avec les profils de la base de données cmap générée par différents composés pharmacologiques (A, B, C, D). Chaque barre représente un gène dont l'expression est modulée par le composé. Un score est ensuite attribué à chaque molécule. Un score proche de -1 signifie que la molécule génère un profil exactement opposé à celui d'intérêt tandis qu'un score de 1 correspond à une molécule générant un profil similaire à celui d'intérêt. Ici, cela signifie que le composé D et dans une moindre mesure le C sont capables de reproduire à un niveau transcriptionnel une grande partie des effets de l'extinction de BMI1. Figure adaptée de Michnick, 2006.

Un score allant de -1 à 1 est en effet attribué à chaque molécule :

- Un score proche de -1 signifie que la plupart des gènes sont modulés de façon totalement opposée entre ces deux profils. Cela peut-être utile si l'on veut faire en sorte que les gènes up-régulés dans un cancer par rapport aux cellules saines (donc

potentiellement oncogéniques) soient réprimés et qu'à l'inverse les gènes down-régulés (des suppresseurs de tumeur) soient de nouveau exprimés.

- Un score proche de 1 signifie au contraire que la majorité des gènes sont retrouvés modulés de la même façon entre ces profils. Une telle molécule s'avère intéressante dans un cas comme le notre où le profil transcriptomique ainsi généré mimerait la perte de fonction d'un oncogène.

La comparaison de notre profil transcriptomique ($BMI1^{high}$ vs $BMI1^{low}$) avec la base de données cmap nous a fourni une liste de molécules potentiellement capable d'induire le même type de profil dans la lignée leucémique HL60. Nous avons vérifié expérimentalement si ces molécules étaient capables d'induire l'expression d'un gène réprimé par BMI1, la cycline G2, et nous avons par la suite testé leur potentiel anti-tumoral sur des lignées de LMC. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'alexidine dihydrochloride. Cette molécule appartient à la famille des bis-biguanides, proche des biguanides (metformine, phenformine) et est couramment utilisée pour ses propriétés antiseptiques dans les bains de bouche ou comme solution désinfectante pour lentilles de contact. Une étude datant de 2006 a présenté l'alexidine comme un potentiel agent anti-cancéreux capable d'induire de l'apoptose dans des cellules de cancer de la tête et du cou sans toutefois en préciser le mécanisme (Yip et al., 2006). Nous allons voir ici le potentiel thérapeutique de cette molécule dans le cas de la LMC.

Résumé de l'étude :

Le répresseur transcriptionnel oncogénique BMI1 est retrouvé surexprimé dans de nombreux cancers. Plusieurs études ont montré que l'extinction de BMI1 dans ces cellules pouvait induire un arrêt de la prolifération, un blocage du cycle cellulaire, de la sénescence ou encore de la mort par apoptose. En utilisant une approche bioinformatique reposant sur la base de données Connectivity Map, nous avons pu rechercher des molécules capables d'induire un profil transcriptomique proches de celui trouvé lors de l'extinction de BMI1 dans des cellules de LMC. Parmi ces molécules nous avons identifié l'alexidine dihydrochloride, un bis-biguanide. Les cellules de LMC traitées à l'alexidine réexprime des cibles transcriptionnelles de BMI1 comme la *CCNG2*/cyclin G2. Les voies AMPK/JNK sont activées par l'alexidine tandis que la voie mTOR est inhibée. L'alexidine induit dans les cellules leucémiques une forte autophagie ainsi que de l'apoptose avec un IC^{50} 3 fois moins élevé que dans des cellules saines. Plus intéressant encore, l'alexidine potentialise les effets de l'imatinib dans des cellules pourtant résistantes à cet inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL. En induisant une forte mort cellulaire dans des cellules Imatinib-résistantes avec de faibles doses de cet ITK, l'alexidine dihydrochloride présente un fort potentiel thérapeutique dans la prise en charge de ces leucémies.

Mots-clés : Alexidine dihydrochloride, LMC, Connectivity Map, ITK-résistance, BMI1

B. Matériels et Méthodes

Culture cellulaire. Les lignées cellulaires de LMC K562 et sa dérivée IMA-R ont été cultivées comme précédemment mentionné. Les cellules IMA-R ont été obtenues en cultivant des K562 en présence de doses croissantes d'imatinib comme décrit (Grosso et al., 2009) et nous ont été fournies par l'équipe du Dr Auberger P.

Réactifs et anticorps. L'imatinib provient d'Enzo Life Science tandis que l'alexidine dihydrochloride et le DAPI proviennent de Sigma-Aldrich. Les anticorps anti-P-4EBP1 (9451), anti-4EBP1 (9644), anti-P-mTOR (2972), anti-mTOR (9271), anti-P-AMPK α (2535), anti-AMPK α (2532), anti-P-JNK (9251), anti-PARP (9542) et anti-LC3-II (12741) sont commercialisés par Cell signaling et l'anti-Cycline G2 (Sc-851) par Santa Cruz Biotechnology. Le réactif WST-1 servant à évaluer le métabolisme mitochondrial provient de Roche.

Evaluation de la survie cellulaire. Les cellules ont été mises en culture à une densité initiale de 1.5×10^5 cellules/ml dans une plaque 96 puits (100 μ l/puit) avec de l'alexidine dihydrochloride ou de l'imatinib aux doses mentionnées en triplicat. Après 48h, 10 μ l de DAPI, pour une concentration finale de 1 μ g/ml, sont ajoutés à chaque puits. Les cellules ont été ensuite analysées par cytométrie en flux (MACSQuant Miltenyi) et les cellules n'ayant pas incorporé le DAPI, donc non-fluorescentes, sont comptées comme vivantes. Les résultats ont ensuite été traités avec le logiciel GraphPad Prism 5 afin de déterminer les IC⁵⁰.

Evaluation du métabolisme mitochondrial. Les cellules ont été cultivées comme cité dans le paragraphe ci-dessus. Après 48h, 10 μ l de réactif WST-1 sont ajoutés à chaque puits et la concentration en orange formazan est mesurée à 490nm.

La coloration au MGG, le western blot, le test de clonogénicité ainsi que la PCR et la PCR quantitative en temps réel ont été décrits dans la section matériels et méthodes du premier projet.

C. Résultats

L'alexidine dihydrochloride, identifiée via le connectivity map, induit l'expression de la cycline G2 dans une lignée cellulaire de LMC.

Dans une précédente étude, nous avons réalisé une analyse transcriptomique à partir de cellules K562 dans lesquelles le répresseur transcriptionnel BMI1 a été inhibé par ARN interférence (GSE54262) (data non publiées). Ce profil transcriptomique a été comparé à la base de données cmap dans le but de rechercher des molécules pharmacologiques capables de reproduire le profil transcriptomique généré par l'extinction de BMI1, score proche de 1 (Figure 18A). Seuls les profils générés dans des cellules HL60 ont été examinés et classés suivant le score généré par le cmap ; l'alexidine dihydrochloride a obtenu le score de 1 dans cette analyse. La capacité des molécules, proposées par l'analyse cmap, à stimuler l'expression de la *CCNG2* dans les cellules K562 a été ensuite mesurée par PCR quantitative. Comme cela a déjà été montré, la rapamycine, un inhibiteur de la voie mTOR, est capable d'induire l'expression de la *CCNG2* et a servi ici de contrôle (Kasukabe et al., 2005). Parmi les molécules issues de l'analyse cmap, seule l'alexidine a été capable d'induire la réexpression de *CCNG2* (Figure 18B). En effet, la cycline G2 est fortement exprimée au niveau ARNm ainsi qu'au niveau protéique après traitement à l'alexidine (Figure 18C). L'alexidine dihydrochloride appartient à la famille des bis-biguanides (Figure 18D) et est couramment utilisée pour ses propriétés antiseptiques.

L'alexidine induit de l'autophagie et de la mort cellulaire dans les cellules K562.

Les capacités anti-tumorales de l'alexidine ont été évaluées sur les cellules de LMC, K562. L'alexidine affecte le métabolisme mitochondrial de façon dose dépendante comme observé dans le test wst-1 (Figure 18E). La mort cellulaire, visualisée par incorporation de DAPI, a été mesurée par cytométrie en flux. L'alexidine induit fortement la mort des cellules K562 ($IC_{50} \approx 1.36 \cdot 10^{-6}$ M) à des doses où elle n'est que très peu efficace sur des lymphocytes périphériques de sujets sains (Figure 18F). Cette molécule reste toutefois toxique pour les cellules saines à des doses plus élevées. Un traitement à l'alexidine induit l'apoptose des cellules K562 comme le montre le clivage de PARP, clivage bloqué par le Q-DD-OPH, un inhibiteur de caspases (Figure 19C). Les propriétés anticancéreuses de cette molécule peuvent

également être observées lors de culture en milieu semi-solide où l'alexidine réduit de façon importante le nombre de cellules initiant des colonies (Figure 19D).

Nous avons montré précédemment que la cycline G2 pouvait induire de l'autophagie après sa réexpression dans les cellules de LMC. L'alexidine induit la vacuolisation des cellules après un traitement de 48h sur les cellules K562 que ce soit en présence ou non d'inhibiteur d'apoptose (Figure 19A). Cette autophagie peut également être visualisée par le clivage de la protéine LC3-I en LC3-II (Figure 19D).

L'alexidine active les voies AMPK et JNK et inhibe la voie mTOR dans les cellules de LMC.

Les voies AMPK et JNK jouent un rôle important dans les phases précoces du processus autophagique en permettant son initiation. Lorsque des cellules cancéreuses sont traitées avec de l'alexidine, on peut observer une forte phosphorylation de ces kinases au cours du temps et cela dès 2h pour P-JNK et dès 4h pour P-AMPK (Figure 19E). Une autre voie de signalisation joue également un rôle important dans la mise en place de l'autophagie lorsqu'elle est inhibée, la voie mTOR. Ainsi, nous pouvons observer une diminution de la phosphorylation de mTOR après traitement à l'alexidine et ce de façon dose dépendante (Figure 19F). L'une de ses cibles directes, 4E-BP1, n'est plus phosphorylée par mTOR dès 1 μ M de traitement.

L'alexidine induit la mort dans les cellules K562 résistantes à l'imatinib et potentialise les effets de cet ITK.

De la même façon que pour les cellules sensibles, l'alexidine affecte fortement le métabolisme mitochondrial des cellules résistantes à l'imatinib (IMA-R) (Figure 20A). Ces cellules présentent également une mort cellulaire importante avec un IC₅₀ proche de celui de la lignée K562 sensible : IC₅₀ $\approx$ 1.94 10^{-6} (Figure 20B). L'intérêt d'une combinaison de l'alexidine avec un ITK, traitement utilisé en première ligne dans la LMC, a par la suite été évalué. Pour cela des cellules résistantes à l'imatinib ont été traitées avec de l'alexidine ou de l'imatinib seul ou en combinaison. Si l'alexidine induit toujours une forte autophagie dans ces cellules (clivage de LC3), la combinaison avec l'imatinib semble réduire cette réponse au profit d'une forte augmentation du clivage de PARP et donc d'une apoptose accrue (Figure 20C). Un traitement des cellules IMA-R avec des doses sub-optimales à la fois d'alexidine

(1 μ M) et d'imatinib (1 μ M) montre un puissant effet inhibiteur de la combinaison des deux drogues sur des cellules mises en culture en méthylcellulose ([Figure 20D](#)). Il est d'autant plus intéressant que ces drogues n'ont quasiment aucun effet sur les cellules IMA-R aux doses utilisées lorsqu'elles sont employées seules. Afin d'évaluer le pouvoir synergique de cette combinaison, des cellules résistantes à l'imatinib ont été traitées avec 3 doses différentes d'alexidine en combinaison ou non avec 3 doses d'imatinib pendant 72h puis la mort cellulaire a été évaluée. Comme vu précédemment, un traitement avec des combinaisons de ces molécules permet de fortement réduire leur concentration tout en restant efficaces. Ainsi, une dose de 1 μ M d'alexidine, qui n'induit dans ces cellules pas plus de 15% de mort cellulaire, utilisée seule, réduit le nombre de cellules vivantes de plus de 70% en présence d'imatinib ([Figure 20E](#)).

D. Figures et légendes

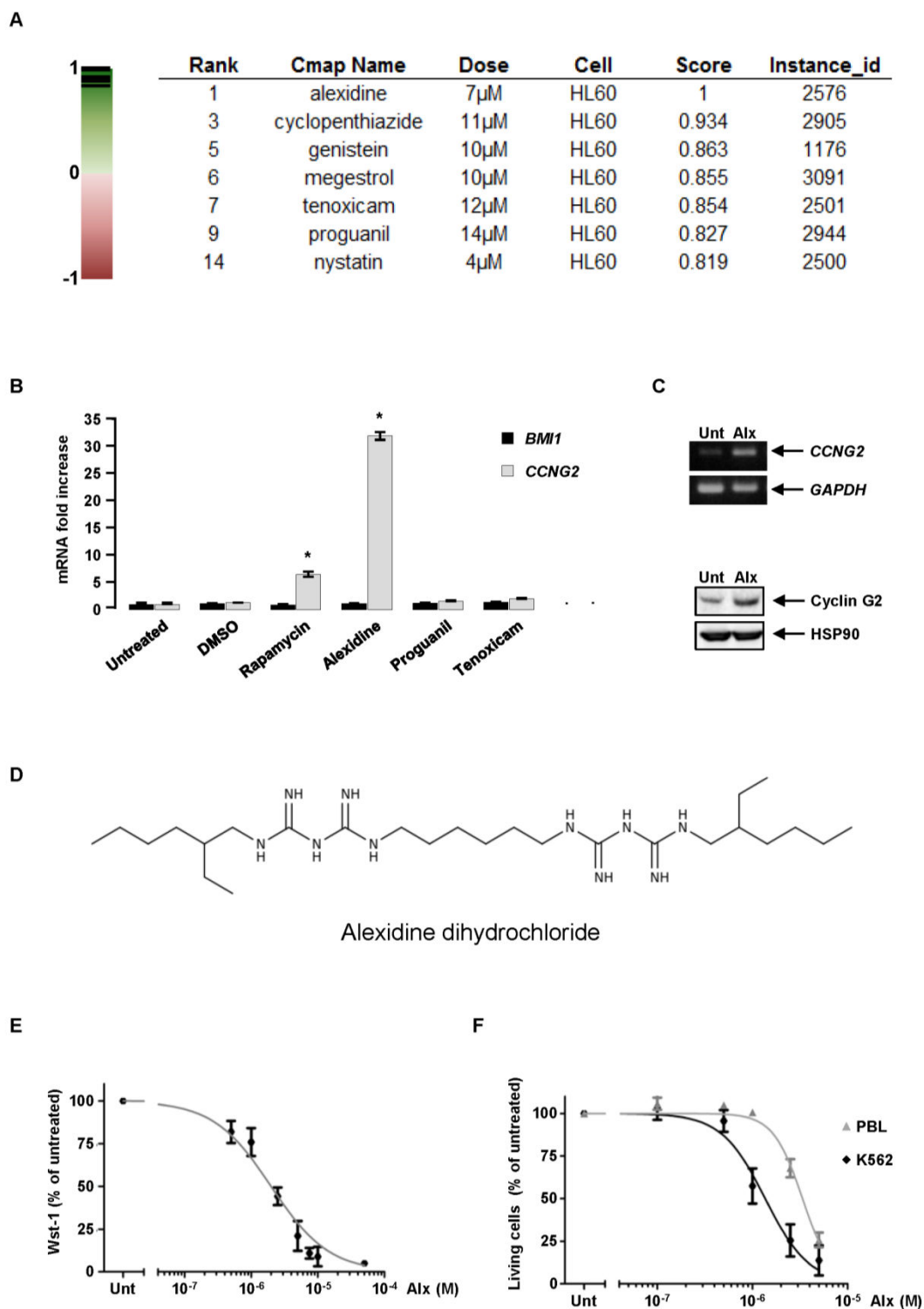


Figure 18. Identification via la base de données cmap d'un activateur de la cycline G2 au fort potentiel anti-tumoral.

Figure 18 : Identification via la base de données cmap d'un activateur de la cycline G2 au fort potentiel anti-tumoral.

(A) Tableau récapitulant les résultats issus de la comparaison du profil transcriptomique généré par l'extinction de BMI1 dans des cellules K562 avec la base de données cmap. Seules les molécules possédant les 7 meilleurs scores et dont le profil a été étudié dans les HL60 sont représentées.

(B) Des cellules K562 ont été stimulées avec : rapamycine (20nM), alexidine dihydrochloride (10µM), proguanil (10µM) et tenoxicam (10µM). Après 6h de traitement les niveaux d'ARNm des gènes *BMI1* et *CCNG2* ont été mesurés par PCR quantitative.

(C) Après 6h de traitements avec 7µM d'alexidine (Alx), les niveaux d'ARNm et de protéines de la cycline G2 ont été mesurés respectivement par PCR semi-quantitative et western-blot.

(D) Représentation la structure chimique d'une molécule d'alexidine dihydrochloride.

(E) Mesure de l'activité mitochondriale, par un test wst-1, après traitement de 48h avec une dose-réponse d'alexidine sur des cellules K562.

(F) Mesure de la survie cellulaire, par cytométrie en flux et incorporation de DAPI, après traitement de 48h avec une dose-réponse d'alexidine sur des cellules K562.

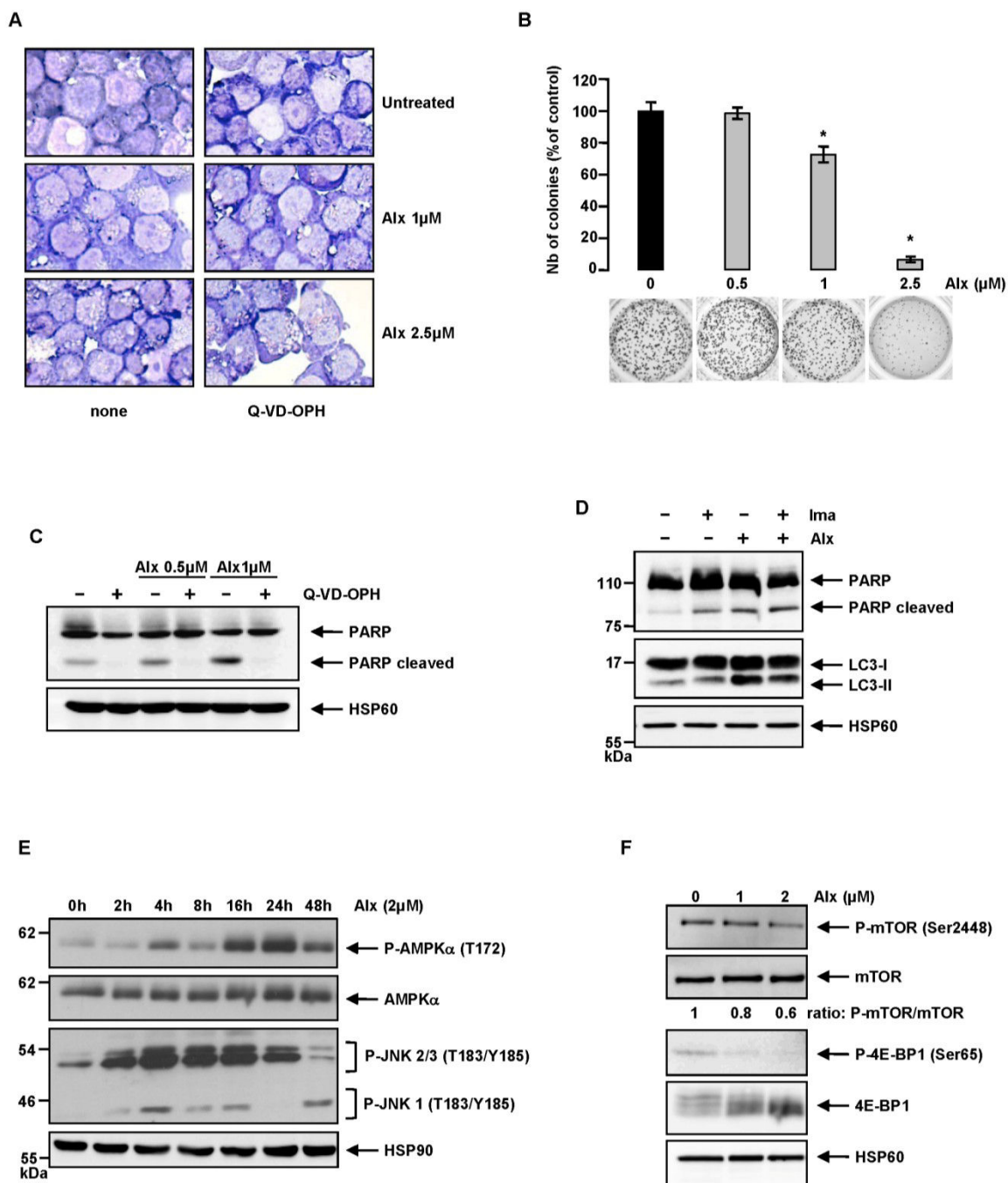


Figure 19. L'alexidine induit de l'autophagie et de l'apoptose dans les cellules K562 et active la voie AMPK α /JNK au détriment de la voie mTOR.

Figure 19 : L'alexidine induit de l'autophagie et de l'apoptose dans les cellules K562 et active la voie AMPK α /JNK au détriment de la voie mTOR.

(A) Après 24h de traitement aux doses d'alexidine indiquées en présence ou non de 10 μ M de l'inhibiteur de caspases Q-VD-OPH, les cellules K562 ont été colorées au May-Grünwald Giemsa afin de pouvoir visualiser la formation de vacuoles.

(B) Des cellules K562 ont été mises en culture en milieu semi-solide de méthylcellulose et stimulées avec de l'alexidine aux doses indiquées afin d'évaluer la capacité de ces cellules à survivre et former des colonies. Après 7 jours les colonies ont été colorées au MTT et comptées.

(C) Des cellules K562 ont été stimulées 24h avec de l'alexidine aux doses indiquées en présence ou non de 10 μ M de Q-VD-OPH. L'apoptose a été évaluée par le clivage de PARP visualisé par western-blot.

(D) Des cellules K562 ont été stimulées 24h avec de l'alexidine (2 μ M) seule ou en combinaison avec de l'imatinib (1 μ M). Les niveaux d'apoptose et d'autophagie ont été évalués respectivement par le clivage de PARP et de LC3-I, visualisé par western-blot.

(E) Une cinétique a été effectuée sur des cellules traitées avec 2 μ M d'alexidine. Les extraits protéiques ont ensuite été analysés par western-blot.

(F) Des cellules ont été stimulées aux doses indiquées d'alexidine et les extraits protéiques analysés par western-bot.

Figure 3

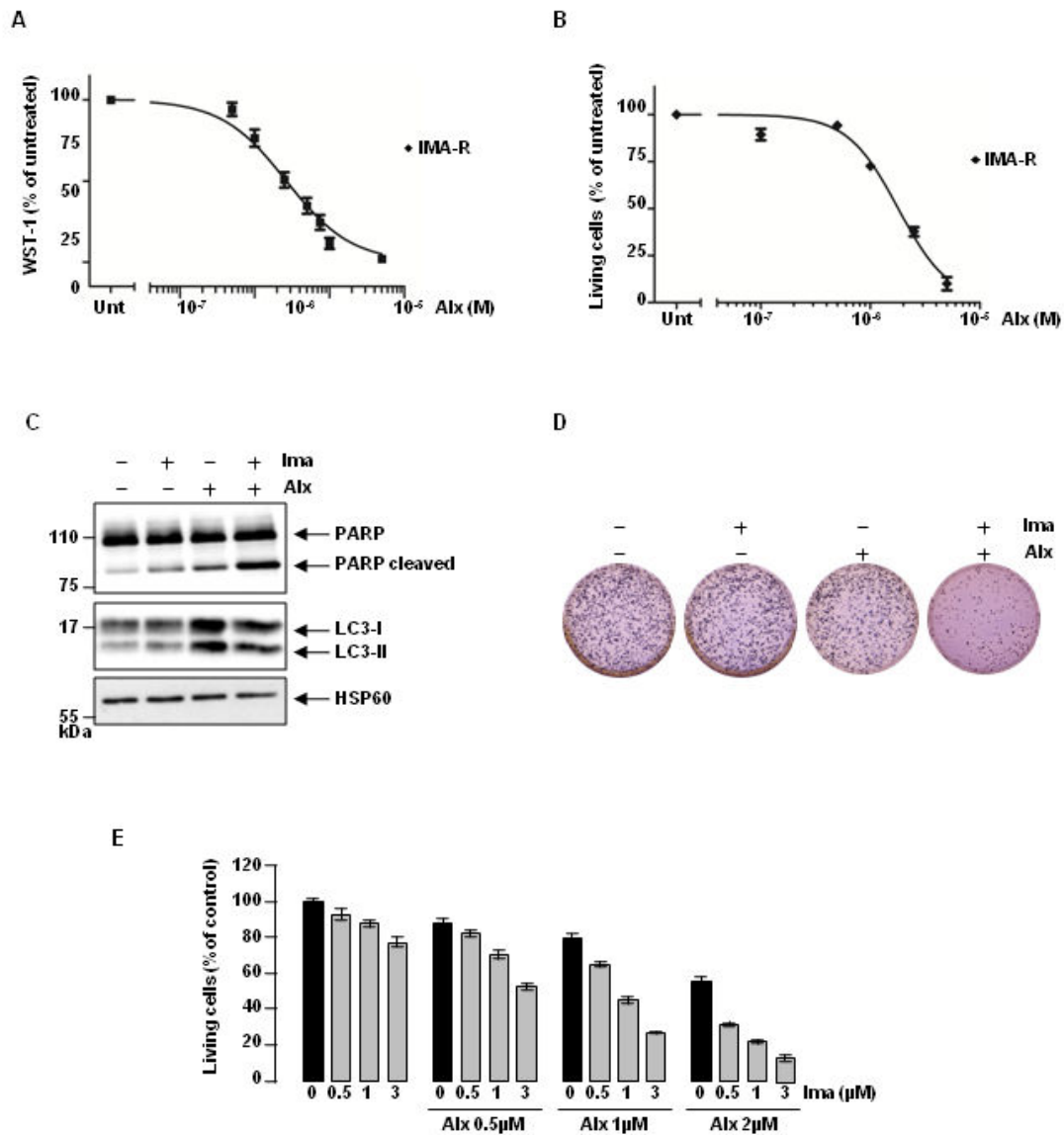


Figure 20. L'alexidine induit de l'autophagie et de la mort dans des cellules K562 imatinib résistantes et les resensibilise à l'imatinib.

Figure 20 : L'alexidine induit de l'autophagie et de la mort dans des cellules K562 imatinib résistantes et les resensibilise à l'imatinib.

(A) Mesure de l'activité mitochondriale, par test wst-1, après traitement de 48h avec une dose-réponse d'alexidine sur des cellules K562 résistantes à l'imatinib (IMA-R).

(B) Mesure de la survie cellulaire, par cytométrie en flux et incorporation de DAPI, après traitement de 48h avec une dose-réponse d'alexidine sur des IMA-R.

(C) Des cellules IMA-R ont été stimulées 24h avec de l'alexidine (2 μ M) seule ou en combinaison avec de l'imatinib (1 μ M). Les niveaux d'apoptose et d'autophagie ont été évalués respectivement par le clivage de PARP et de LC3-I, visualisé par western-blot.

(D) Des cellules IMA-R ont été mises en culture en milieu semi-solide de méthylcellulose et stimulées avec de l'alexidine (1 μ M) ou de l'imatinib (1 μ M) ou une combinaison des deux composés afin d'évaluer la capacité de ces cellules à survivre et former des colonies. Après 7 jours les colonies ont été colorées au MTT et comptées.

(E) Des cellules IMA-R ont été stimulées avec des combinaisons de drogues, alexidine et imatinib, aux doses indiquées. Après 48h la survie cellulaire a été évaluée, par cytométrie en flux après incorporation de DAPI.

E. Brève discussion

Une approche bioinformatique, via la base de données cmap, nous a permis d'identifier une molécule pharmacologique capable d'induire le profil transcriptomique généré par l'extinction de BMI1 dans les cellules de LMC. L'alexidine dihydrochloride appartient à la famille des bis-biguanides, proche des biguanides comme la metformine. Dans cette étude, nous montrons que cette molécule est capable de réinduire l'expression de gènes normalement réprimés par BMI1, comme le suppresseur de tumeur Cycline G2. L'alexidine induit à la fois de l'autophagie et de l'apoptose dans les cellules K562. Elle induit également l'activation de la voie AMPK/JNK tandis que la voie mTOR est inhibée. L'inhibition de la voie mTOR par son inhibiteur la rapamycine a été montrée comme pouvant induire l'expression de la *CCNG2* dans le cancer du sein. Il est possible qu'en inhibant cette voie l'alexidine réactive l'expression de la cycline G2. À l'inverse, il est possible que ce soit la cycline G2 qui en activant la voie AMPK, comme nous l'avons précédemment montré, inhibe la voie mTOR. L'alexidine n'a que très rarement été étudiée chez les mammifères, ses propriétés principales étant antiseptiques. Toutefois, il a été montré que ce bis-biguanide pouvait inhiber une protéine phosphatase localisée à la mitochondrie (PTPMT1) (Doughty-Shenton et al., 2010). Cette phosphatase est retrouvée activée dans plusieurs cancers, notamment dans certains cas de LAM et LAL-T. Son inhibition aboutit à un stress mitochondrial dérégulant la synthèse d'ATP ce qui induit la mort des cellules (Weisberg et al., 2014). Même si l'expression de la cycline G2 est stimulée en présence d'alexidine, il est difficile d'évaluer la part que prend cette cycline dans les effets délétères induits par la molécule. Cette étude a toutefois mis en évidence le fait que l'alexidine est capable de resensibiliser des cellules résistantes à de faibles doses d'imatinib. Une thérapie combinant ces deux molécules pourrait s'avérer particulièrement intéressante chez des patients résistants ou supportant mal de fortes doses d'ITK. Ces derniers résultats seront abordés dans la discussion générale présentée dans la section suivante.

Discussion et Perspectives

IX. Discussion

Mes travaux de thèse ont contribué à une meilleure compréhension du rôle de la protéine polycomb BMI1 au sein des cellules leucémiques de LMC et ont révélé une toute nouvelle fonction pour cette protéine. Les différents axes de ce projet ont mis en évidence que :

- BMI1 est requis pour le maintien des cellules de LMC.
- BMI1 présente un nouveau rôle participant au soutien des cellules cancéreuses en assurant l'inhibition d'une autophagie qui leur serait délétère.
- BMI1, au sein du complexe PRC1, réprime directement le gène suppresseur de tumeur de la cycline G2 dans les cellules leucémiques.
- La Cycline G2 induit l'autophagie dans les cellules cancéreuses en permettant l'activation de la protéine kinase PKC ζ (via son interaction avec le complexe phosphatase PP2A).
- La PKC δ , ainsi que des kinases de la famille Src, sont impliquées dans la surexpression de BMI1 retrouvée dans les cellules de LMC.
- L'alexidine, un bis-biguanide, est capable d'induire l'expression de gènes réprimés par BMI1 et provoque la mort des cellules de LMC sensibles ou résistantes à l'imatinib.

BMI1 et LMC :

Il n'existe que peu d'études traitant du rôle de BMI1 dans le développement ou le maintien de la leucémie myéloïde chronique. Les premières d'entre elles ont mis en évidence le fait que le niveau d'expression de BMI1 augmentait avec la progression de la maladie vers ses phases les plus agressives et l'ont ainsi proposé comme marqueur de pronostic (Mohty et al., 2007; Rizo et al., 2010). Plusieurs groupes ont démontré que ce polycomb jouait un rôle important dans la transformation leucémique ainsi que dans le maintien de la pathologie sur le

long terme. Il a été mis en évidence que sa présence était requise pour une transformation durable de cellules CD34⁺, issues de cordons ombilicaux humains, avec l'oncogène BCR-ABL (Rizo et al., 2010). De plus, BMI1 accélère la croissance tumorale et mime la progression de la phase chronique vers la phase blastique lorsqu'il est surexprimé dans un modèle murin de la pathologie (consistant en une expression ectopique du gène *BCR-ABL* dans le compartiment des cellules souches hématopoïétiques) (Sengupta et al., 2012).

Des chercheurs ont tenté de bloquer l'expression de BMI1 dans des cellules de lignées de LMC (Merkerova et al., 2007). Ils ont pour cela utilisé des siRNA dirigés contre BMI1 et tout comme dans notre étude ils n'ont observé aucun mécanisme de mort cellulaire. En revanche, contrairement à nos observations, ils n'ont mis en évidence aucun effet de l'extinction de BMI1 sur la prolifération ou le cycle cellulaire ce qui peut néanmoins s'expliquer par la cinétique relativement courte (4 jours) qu'ils ont utilisée. De plus, dans cette même étude, ils indiquent que l'extinction de BCR-ABL par siRNA n'affecte en rien l'expression de BMI1 contrairement à ce que nous ou d'autres montrons (Bhattacharyya et al., 2009). Notre étude est ainsi la première à mettre en évidence le rôle de BMI1 au sein des cellules cancéreuses de ce type ainsi que les processus biologiques que ce répresseur transcriptionnel contrôle dans le cadre de la LMC.

Autophagie et cancer :

L'autophagie est un processus cellulaire permettant l'élimination et le recyclage du contenu cellulaire dans le but de faire face à un stress, qu'il soit nutritif, hypoxique, lié au réticulum endoplasmique ou encore infectieux. Généralement considéré comme un mécanisme de survie cellulaire, lorsque celui-ci est dépassé il peut induire la mort de la cellule. Le terme autophagie regroupe en réalité trois processus distincts : la macro-autophagie (le plus souvent simplement appelé autophagie), la micro-autophagie et enfin l'autophagie médiée par les chaperonnes. Ici nous utiliserons le terme autophagie comme faisant référence à la macro-autophagie.

Le rôle de l'autophagie dans le développement et le maintien des pathologies cancéreuses demeure très ambigu. Ce rôle peut être pro- ou anti-tumoral selon le type de cancer étudié, son stade de développement, le type cellulaire observé ainsi que les gènes fonctionnels ou non au sein de ces cellules. Plusieurs thérapies sont ainsi basées sur l'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTOR, en utilisant par exemple la rapamycine et ses

dérivés, dans le but d'induire une autophagie délétère pour les cellules cancéreuses. Le temsirolimus et l'everolimus, deux de ces dérivés, sont actuellement utilisés dans le traitement de métastases issues de cellules de carcinomes rectaux (Hudes et al., 2007; Motzer et al., 2008). À l'inverse, des thérapies anticancéreuses sont axées sur l'inhibition de l'autophagie considérée comme favorisant la survie cellulaire dans certains types de cancers. C'est le cas de l'utilisation de l'hydroxychloroquine, l'un des principaux médicaments de lutte contre le paludisme, capable d'inhiber l'autophagie et actuellement testé dans de nombreux essais cliniques, comme dans le cas du glioblastome multiforme (Rosenfeld et al., 2014).

Dans le cas de la LMC, les thérapies actuellement utilisées (imatinib, dasatinib et nilotinib) provoquent la mort des cellules cancéreuses par apoptose mais induisent également une forte autophagie (Ertmer et al., 2007; Milano et al., 2009). Cette autophagie est vue dans ce cadre comme protectrice car son inhibition, en utilisant de la chloroquine ou des siRNA dirigés contre différentes protéines ATG, potentialise la mort cellulaire induite par les ITKs (Bellodi et al., 2009). Cette étude indique également que cette combinaison de traitements semble plus efficace sur les CSL de LMC que l'imatinib seul. Depuis, plusieurs études préconisent de bloquer cette autophagie induite par les ITKs et un essai clinique, CHOICES³, dont le but est d'évaluer l'efficacité de l'ajout d'hydroxychloroquine à un traitement à l'imatinib pour des patients atteints de LMC, a été lancé en septembre 2013.

En lien avec le fait que les ITKs induisent de l'autophagie en inhibant BCR-ABL, l'équipe de Michael R. Green a démontré que BCR-ABL réprime l'autophagie dans les cellules nouvellement transformées (Sheng et al., 2011). Ce blocage de l'autophagie passe par l'activation de la voie PI3K/AKT/FOXO4/ATF5/mTOR. Comme nous l'avons montré dans notre étude, BMI1 est également impliquée dans la répression de l'autophagie ce qui suggèrerait que cette étape pourrait être impliquée dans le processus de transformation. De plus, BMI1 pourrait également participer à la stabilisation de la protéine BCR-ABL, laquelle pourrait être clivée puis dégradée lors de l'activation de l'autophagie dans ces cellules (Goussetis et al., 2012). L'inhibition de BCR-ABL, par l'imatinib ou via l'utilisation de shRNA, nous a permis de démontrer que l'activation de cette kinase est responsable de la surexpression de BMI1 dans les cellules de LMC. En retour, BMI1 collabore ainsi avec BCR-ABL dans la transformation de la cellule et stimule la progression de la pathologie.

³ Essai de phase II randomisé d'imatinib (IM) versus hydroxychloroquine (HCQ) et IM pour les patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) en réponse cytogénétique majeure (RCyM) avec une maladie résiduelle détectable par PCR quantitative (RQ-PCR). [NCT01227135](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01227135)

L'extinction de BMI1 provoque une autophagie délétère pour les cellules de LMC contrairement à celle induite par les ITKs. C'est également le cas avec l'utilisation du resvératrol (Puissant et al., 2010), du trioxyde d'arsenic (Sheng et al., 2011) ou encore d'acadésine (Robert et al., 2009). Un des avantages de maintenir une autophagie forte lors de la chimiothérapie est de favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, le groupe de Guido Kroemer a publié en 2011 un article démontrant que l'autophagie permettait la relâche d'adénosine triphosphate (ATP) lors de la mort cellulaire. Cet ATP a pour effet de recruter plusieurs cellules associées à la réponse anti-tumorale comme les cellules dendritiques ou des lymphocytes T au sein du micro-environnement tumoral participant ainsi à la réponse immunitaire (Michaud et al., 2011). Perturber la fonction de BMI1 dans les cellules de LMC combiné avec l'utilisation d'un ITK pourrait ainsi permettre l'induction d'une réponse anti-tumorale lors de la mort cellulaire tout en limitant le potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches.

Autophagie et cellules non cancéreuses :

BMI1 est étroitement lié au phénotype souche, il est d'ailleurs très fortement exprimé dans plusieurs types de cellules souches allant des CSE aux différentes cellules souches adultes : hématopoïétiques (CSH), neuronales (NSC), hépatiques, etc. Les CSH devant se maintenir sur le très long terme, environ la durée de vie de l'organisme, doivent pouvoir résister aux différents stress qu'elles rencontrent. En 2013, dans une publication dans la revue scientifique Nature, le groupe d'Emmanuelle Passegué a mis en évidence le rôle de l'autophagie au sein du compartiment hématopoïétique au cours du vieillissement (Warr et al., 2013). Ainsi, ils montrent que le flux autophagique est très faible dans les CSH les plus immatures contrairement aux cellules progénitrices granulocyte/macrophage (PGM) qui sont en partie engagées sur la voie de la différenciation. En revanche, lors d'un stress (un manque de cytokines dans le milieu utilisé, ou une déplétion en nutriments), la réponse autophagique au sein des CSH est bien plus importante que dans les PGM. Ceci est dû à l'expression de FOXO3A qui maintient le système autophagique dans un état « prêt à faire face », c'est à dire non ou faiblement actif mais réceptif au moindre signal nécessitant son activation (ce qui n'est pas sans rappeler, dans un autre contexte, la fonction des domaines bivalents). Il est connu que l'expression de BMI1 diminue avec l'état de différenciation des cellules hématopoïétiques et il serait intéressant de savoir si cela peut être corrélé avec le niveau du

flux autophagique basal. Dans la même étude, les CSH de souris jeunes ont été comparées à celles de souris plus âgées (24 mois). Bien que la réponse autophagique en cas de stress soit identique, les cellules âgées présentaient un flux autophagique basal bien plus élevé que celui retrouvé chez des souris plus jeunes. Là encore des études semblent indiquer que le niveau d'expression de plusieurs polycombs diminue avec l'âge dans le compartiment souche (Klauke and de Haan, 2011). On retrouve ainsi une même tendance au sein des CSN qui avec l'âge voient leur niveau d'expression de BMI1 diminuer (Abdoun et al., 2012) tandis que le flux autophagique basal des cellules de l'hippocampe augmente avec l'âge (Gamerding et al., 2009). Le vieillissement voit beaucoup de processus cellulaires se dégrader ou fonctionner moins bien mettant ainsi en danger l'intégrité de la cellule. Une autophagie exacerbée au sein des cellules âgées participe à gommer certains de ces dysfonctionnements et assure la survie de ces cellules, une sorte de mécanismes compensatoires.

Lors de la différenciation cellulaire, la cellule subit de grandes transformations, l'un des processus récurrents impliqué dans ces transformations est l'autophagie. Les protéines BMI1 et Cyclin G2 peuvent également être impliquées dans de tels processus. La différenciation adipocytaire requiert par exemple une autophagie active pour être complète (Guo et al., 2013). De la même façon, au cours de la différenciation adipocytaire, la cycline G2 est up-régulée et active le récepteur nucléaire PPAR γ . Cette protéine, en régulant l'expression de facteurs adipocytaires, est essentielle à la différenciation du pré-adipocyte en adipocyte mature (Aguilar et al., 2010). Comme dans notre modèle, l'induction de l'autophagie nécessaire à cette différenciation pourrait prendre sa source dans l'expression de la cycline G2. De la même manière il serait intéressant de voir si dans certaines lignées hématopoïétiques l'extinction de BMI1 ne pourrait pas stimuler une autophagie nécessaire à la différenciation de ces cellules.

Cycline G2 et cancer :

La cycline G2 est une cycline atypique car contrairement aux autres cyclines aucune protéine cycline-dépendante kinase (CDK) connue ne lui est associée. Cette cycline joue le rôle de frein du cycle cellulaire en inhibant cdk2 ou en régulant directement p53 via son interaction avec PP2A. *CCNG2* est généralement considéré comme un gène suppresseur de tumeur que l'on retrouve réprimé dans de nombreux cancers comme par exemple le

carcinome colorectal ou encore les cancers de l'œsophage ou de la thyroïde (Chen et al., 2014a; Li et al., 2013; Sun et al., 2014). La réexpression de la cycline G2 joue un rôle important dans les effets de certains agents chimiothérapeutiques comme la doxorubicine ou l'hydroxytyrosyl ethyl ether dans le cas du cancer du colon ou encore des inhibiteurs d'histone déacétylases (HDAC) dans le traitement du neuroblastome (Marshall et al., 2010; Pereira-Caro et al., 2013; Zimmermann et al., 2012). Dans ce dernier article, HDAC2 interagit avec c-MYC pour se lier au promoteur de la *CCNG2* et empêche ainsi sa transcription. L'un des sites d'interactions du complexe HDAC2/c-MYC présent sur ce promoteur se situe au niveau du site d'initiation de la transcription. C'est également dans cette zone que nous avons montré que BMI1 et CBX8 pouvaient interagir avec le promoteur de la *CCNG2*. Sachant que le facteur de transcription c-MYC est surexprimé dans les cellules de LMC, il pourrait participer au recrutement du complexe PRC1, auquel appartient BMI1, au niveau de ce promoteur. L'interaction des PRCs avec des facteurs de transcription semble en effet un mode de recrutement important, chez les mammifères, de ces modificateurs d'histones auprès de leurs cibles.

Il convient néanmoins de tenir compte que dans certains cancers la cycline G2 peut jouer un rôle pro-tumoral. Généralement l'expression de cette protéine est alors stimulée par un environnement hypoxique. C'est le cas du glioblastome où l'expression de la cycline G2 est nécessaire à l'expansion de la tumeur (Fujimura et al., 2013) ou encore dans le cancer du pancréas où son expression permet la progression de la pathologie (Rothermund et al., 2005). Un environnement hypoxique peut s'avérer très délétère pour les cellules, qu'elles soient cancéreuses ou non, et l'un des mécanismes permettant aux cellules de résister à un tel stress est l'autophagie. La régulation de la cycline G2 par le facteur de transcription induit par l'hypoxie, HIF, pourrait avoir pour but de stimuler un processus autophagique pro-survie dans ces cellules.

Induire la réexpression de la cycline G2 dans les cellules cancéreuses présente un fort potentiel thérapeutique mais il faudra cependant bien prendre en compte le type de cancer visé, et très certainement son stade, afin d'éviter des effets pro-tumoraux.

L'alexidine comme traitement anticancéreux :

L'utilisation de la base de données Connectivity Map (cmap) nous a permis d'identifier un composé capable de stimuler l'expression de la cycline G2 dans notre modèle. L'alexidine est un composé chimique appartenant à la famille des bis-biguanides qui s'est avéré capable d'induire l'expression de la cycline G2 dans notre modèle. Les effets de cette drogue sur les cellules de LMC demandent à être plus amplement étudiés mais nous avons pu déjà démontrer que l'alexidine induit à la fois de l'autophagie et de la mort cellulaire par apoptose. Ces processus cellulaires semblent passer par l'activation de la voie AMPK et l'inhibition de la voie mTOR. Ces voies ont déjà été visées par divers composés dans le cadre de la LMC dans de précédentes études. En affectant ces voies, ces composés se sont montrés particulièrement efficaces à éliminer les cellules leucémiques. On peut citer parmi ces études l'utilisation du resvératrol qui, à la fois dans les cellules sensibles et les cellules résistantes aux ITKs, induit de l'autophagie à travers l'inhibition de mTOR (due à l'activation de l'AMPK). En plus de l'autophagie, le resvératrol induit dans ces cellules une forte apoptose qui permet leur élimination ce qui se rapproche énormément de ce que l'on peut voir avec l'alexidine (Puissant et al., 2010). Une étude plus récente a démontré que la metformine en activant l'AMPK et en inhibant mTOR conduit les cellules de LMC vers des voies de morts cellulaires (Vakana et al., 2011). La metformine appartient à une famille moléculaire proche de l'alexidine, les biguanides. Les biguanides ont été principalement utilisés comme antidiabétiques, c'est par exemple le cas de la phenformine ou de la metformine, ou bien encore comme antipaludéen avec le proguanil. Depuis quelques années, les études utilisant la metformine comme traitement anticancéreux en monothérapie ou en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques se sont multipliées, tout comme les traitements utilisant des activateurs de l'AMPK (Rosilio et al., 2014 pour revue). Dans notre modèle, l'alexidine est utilisé au 1 000^{ème} de la concentration utilisée avec la metformine et s'avère bien plus efficace à éliminer les cellules leucémiques. Bien que son mode d'action doive certainement s'en éloigner, il pourrait s'avérer très intéressant d'utiliser l'alexidine dans d'autres types de cancers où la metformine s'est déjà montrée efficace. De plus, la famille des bis-biguanides à laquelle appartient l'alexidine contient d'autres membres qui pourraient avoir des effets similaires sur les cellules cancéreuses.

Cibler les facteurs participant au maintien des CSL :

L'arrivée de l'imatinib, puis des ITKs de 2^{ème} et maintenant de 3^{ème} génération, a bouleversé le traitement des patients atteints de LMC et grandement amélioré leur espérance de vie. Toutefois, ces traitements ne sont pas parfaits. L'étude IRIS (International Randomized Study of Interferon and ST1571) a permis de mettre en évidence qu'environ 30% des patients devaient arrêter leur traitement à l'imatinib (ST1571) pour des raisons d'intolérance à cet ITK ou d'une trop faible réponse à celui-ci. De plus, le traitement au nilotinib ou au dasatinib des patients de LMC provoque une toxicité de grade 1-2 chez 30 à 60% d'entre eux et de grades plus élevés, 3-4, pour 20% d'entre eux (Druker et al., 2006). Enfin, à cela s'ajoutent les cas de résistances aux ITKs comme la mutation T315I de BCR-ABL, les patients en phase blastique de la pathologie qui demeurent insensibles aux traitements et bien sûr les CSL qui échappent aux traitements et sont responsables des cas de rechutes de la maladie. La recherche de nouveaux traitements dans le cadre de la LMC représente un champ d'investigations toujours d'actualité pour de nombreux groupes.

Parmi ces groupes, certains s'intéressent principalement au ciblage des voies de signalisation associées aux CSL. L'interféron- α (IFN- α) était le traitement de première ligne des patients atteints de LMC avant l'arrivée des ITKs ciblant BCR-ABL et actuellement plusieurs essais cliniques évaluent l'effet que pourrait avoir la combinaison de ces deux traitements. Les patients profitant des deux traitements présentent généralement un pourcentage de RMM plus important (Preudhomme et al., 2010). Toutefois, l'IFN- α présente une toxicité importante pour l'organisme et une partie importante des patients est contrainte d'arrêter ce traitement avant de pouvoir profiter des bénéfices qu'il apporte. Le mode d'action de l'IFN- α n'est pas encore très bien caractérisé mais il pourrait stimuler les CSL et les faire cycler ce qui les rendrait plus sensibles aux ITK (Essers et al., 2009). L'IFN- α pourrait également stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale (Belardelli et al., 2002).

CXCR4 est un récepteur à chimiokines et est impliqué dans le chimiotactisme des cellules souches hématopoïétiques permettant leur migration vers le stroma, niche de la moelle osseuse. BCR-ABL réprime ce récepteur ce qui a pour effet de limiter les interactions des cellules leucémiques avec le stroma et abouti à leur dissémination. Les ITKs, en inhibant BCR-ABL, induisent la réexpression de CXCR4 au sein des cellules leucémiques qui migrent alors vers la niche de la moelle osseuse (Jin et al., 2008). Ce micro-environnement s'avère protecteur et est impliqué dans le maintien des CSL. Des chercheurs ont utilisé un inhibiteur

de CXCR4, l'AMD3100, en combinaison avec des ITKs et ont montré qu'en absence de ce récepteur les cellules exprimant BCR-ABL ne peuvent plus interagir avec les cellules stromales (Weisberg et al., 2012). Un essai clinique est actuellement en cours.

Les voies de signalisation Wnt/ β -catenin et Hedgehog sont très importantes pour le maintien sur le long terme des CSH mais aussi des CSL. L'utilisation d'inhibiteurs de ces voies, SB216763 pour la première et cyclopamine ou LDE225 pour la seconde, en combinaison avec des ITKs s'avère très efficace sur les cellules souches ou progénitrices de LMC. Elles limitent les capacités d'auto-renouvellement de ces cellules et en induisent la mort (Reddiconto et al., 2012; Zhao et al., 2009).

De nombreux chercheurs étudient les moyens de cibler les facteurs et les mécanismes essentiels à la survie et au maintien des CSL. En cherchant à caractériser le rôle de BMI1 au sein des cellules leucémiques et à en perturber la fonction, notre étude s'insère dans cette logique de recherche. Très récemment le groupe de John E. Dick a publié une étude dans *Nature Medicine* dans laquelle il met en évidence l'intérêt de cibler les capacités d'auto-renouvellement des cellules initiatrices de cancer à travers l'inhibition de BMI1 (Kreso et al., 2014). La première partie de l'article montre que l'extinction de BMI1 par shRNA est suffisante pour bloquer la croissance tumorale, la prolifération cellulaire, les capacités d'auto-renouvellement ainsi que la fréquence des CIC dans un modèle de xénogreffe murin de cellules de cancer colorectal. Ces résultats sont cohérents avec ce que nous avons pu trouver avec l'extinction de BMI1 dans les lignées cellulaires de LMC. De manière plus intéressante, la seconde partie porte sur l'identification d'une nouvelle molécule, PTC-209, capable d'interagir avec le transcrit *BMI1* et d'empêcher sa traduction induisant ainsi les mêmes effets que l'extinction par shRNA. Peu de choses sont connues au sujet de cette molécule que ce soit sa spécificité vis à vis de BMI1 ou encore ses éventuels effets cytotoxiques sur le reste de l'organisme. Toutefois, l'utilisation d'une telle molécule en combinaison ou non avec d'autres agents anticancéreux possède un intérêt thérapeutique fort pour le traitement du cancer colorectal et de la LMC mais aussi de la quasi-totalité des cancers tant le problème posé par les cellules souches cancéreuses est universel.

L'ensemble de ces travaux soulève toutefois un point important. La fin des années 90 et le début des années 2000 ont vu naître et se développer le concept de thérapie ciblée dont l'imatinib a été le fer de lance. Dans le cadre de la LMC, on a pu voir par la suite que les ITK de secondes et troisièmes générations ont été sélectionnés pour leur capacité à cibler d'autres

kinases en plus de BCR-ABL, comme les kinases de la famille Src ou encore les Aurora kinases pour les plus récents. Désormais, plusieurs études et essais cliniques visent des voies assurant la survie des CSL (Sinclair et al., 2013 pour revue). Malheureusement contrairement à BCR-ABL, qui est une protéine de fusion, la majorité des processus visés, que ce soit l'autophagie, l'auto-renouvellement ou encore la protection offerte par le stroma niche de la moelle osseuse sont essentiels aux CSH mais également à l'ensemble des cellules souches adultes de l'organisme. Le principal intérêt de la thérapie ciblée est de limiter les effets sur les cellules saines, il est possible que perturber les processus précédemment cités puisse avoir des effets secondaires désastreux sur l'ensemble des cellules qui assurent l'homéostasie des tissus à court, moyen et très long terme, à l'échelle d'une vie humaine. Les effets indésirables de tels traitements ne pourraient être visibles qu'au bout de plusieurs années, il convient donc de rester prudent et attentif lors de l'usage de telles thérapies.

X. Perspectives

La suite de ce travail consistera à valider nos résultats dans un modèle plus physiopathologique. Pour cela plusieurs solutions s'offrent à nous. Il existe différents modèles murins de LMC qui permettraient de transduire un vecteur lentiviral exprimant la cycline G2 ou un shRNA dirigé contre BMI1 à différents stades de développement de la pathologie. La régulation de la cycline G2 et donc de l'autophagie par BMI1 pourrait avoir un rôle différent à l'initiation de la maladie, au cours de la transformation, de la progression ou encore dans ses phases les plus avancées.

Un autre moyen de se rapprocher de la pathologie serait d'accéder à des échantillons de patients et plus particulièrement à des cellules présentant des caractères souches (CD34⁺). Evaluer comment la cycline G2 et l'autophagie peuvent affecter les propriétés de ces cellules comme leur fréquence (via des expériences de dilution limite), leur capacité à former des colonies ou encore à se différencier pourrait s'avérer opportun. D'un point de vue plus physiologique réaliser ces études dans des cellules souches issues de sang cordon pourrait nous permettre de mieux comprendre comment l'autophagie et BMI1 s'articulent dans les phases de maintien des caractères souches ou au contraire lors de la différenciation. De plus, sachant que BMI1 est surexprimé dans de nombreux cancers il pourrait être intéressant d'élargir cette étude à d'autres modèles cancéreux.

De nouveaux inhibiteurs ou activateurs plus spécifiques de chaque isoformes des PKC sont apparus ces dernières années. Il pourrait s'avérer très bénéfique pour plusieurs pathologies cancéreuses d'inhiber la PKC δ ou bien encore d'activer la PKC ζ . Tester de telles molécules dans notre modèle pourrait être pertinent. Enfin, l'alexidine semble posséder un fort pouvoir anti-tumoral sur les cellules résistantes de LMC lorsque celle ci est combinée à l'imatinib. Tester cette molécule sur des cellules de LMC présentant d'autres types de résistance pourrait s'avérer pertinent, tout comme le fait d'étudier d'autres types de bis-biguanides qui pourraient se montrer plus affins encore pour les cellules cancéreuses que pour les saines.

Conclusion

Ce projet de thèse m'a permis dans un premier temps de mettre en évidence un nouveau rôle pour le répresseur transcriptionnel oncogénique BMI1 ainsi que pour sa cible suppresseur de tumeur, la cycline G2. La deuxième partie de cette thèse a été consacrée à la recherche de moyens de cibler ces protéines dans un intérêt thérapeutique. L'ensemble de ces axes permet de proposer le modèle suivant synthétisé sous la forme d'un schéma (Figure 21).

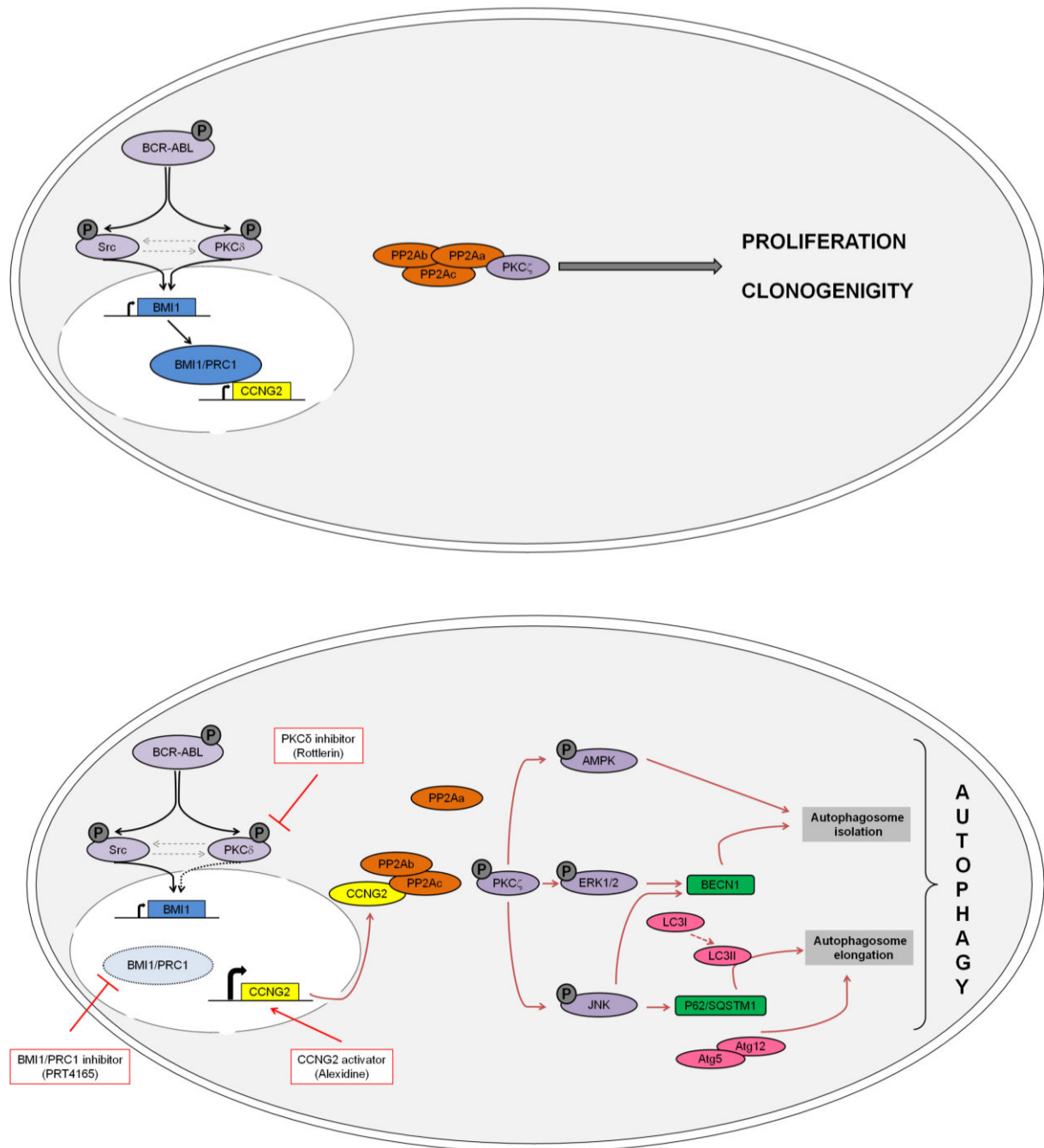


Figure 21. Modèle de la régulation de BMI1 et de son rôle dans les cellules de Leucémie Myéloïde Chronique.

Dans ce modèle, l'oncogène BCR-ABL se trouve à la source de la régulation de BMI1. En phosphorylant la PKC δ , cette dernière va activer, probablement via l'un de ses effecteurs, le promoteur de BMI1 de façon aberrante conduisant ainsi à sa surexpression. Une fois surexprimé BMI1 va réprimer la transcription de nombreux gènes cibles, dont la cycline G2, participant ainsi à la stimulation de la prolifération cellulaire, du métabolisme mitochondrial et du potentiel clonogénique des cellules de LMC. Sans cycline G2 dans la cellule, la PKC ζ reste séquestrée par le complexe phosphatase PP2A.

Parvenir à empêcher BMI1 d'assurer sa fonction peut permettre la réexpression de suppresseurs de tumeur. C'est le cas avec la cycline G2 qui, lorsqu'elle est exprimée dans le cytoplasme, interagit avec la sous unité catalytique du complexe phosphatase, PP2Ac. En faisant cela, la cycline G2 perturbe les interactions entre la sous-unité PPAA et le reste du complexe ce qui aboutit à son exclusion libérant ainsi la PKC ζ qu'elle séquestre. Une fois active cette protéine va stimuler les voies de régulations de l'autophagie en phosphorylant les kinases AMPK α , ERK1/2 et JNK. Ceci a pour conséquence d'activer le flux autophagique à travers le clivage de LC3-I en LC3-II, l'expression de BECN1, de P62SQSTM1 ainsi que la formation du complexe ATG5-ATG12. Cette autophagie s'avère alors fortement délétère pour les cellules cancéreuses qui présentent une forte altération de leur capacité proliférative ou encore clonogénique.

Perturber la fonction de BMI1 relève donc d'un fort intérêt thérapeutique et peut se faire de différentes façons :

- Indirectement, en affectant les voies de signalisation en amont de sa surexpression comme avec des inhibiteurs de la PKC δ (ex : rottlerine).
- Directement, en empêchant son interaction avec son partenaire enzymatique RING1B (PRT4165).
- Ou en agissant en aval, en réinduisant directement l'expression de ces cibles comme pour la Cycline G2 (alexidine dihydrochloride).

Bibliographie

Bibliographie

- Abdouh, M., Chatoo, W., El Hajjar, J., David, J., Ferreira, J., and Bernier, G. (2012). Bmi1 is down-regulated in the aging brain and displays antioxidant and protective activities in neurons. *PLoS One* 7, e31870.
- Agarwal, A., Bumm, T.G., Corbin, A.S., O'Hare, T., Loriaux, M., VanDyke, J., Willis, S.G., Deininger, J., Nakayama, K.I., Druker, B.J., *et al.* (2008). Absence of SKP2 expression attenuates BCR-ABL-induced myeloproliferative disease. *Blood* 112, 1960-1970.
- Aguilar, V., Annicotte, J.S., Escote, X., Vendrell, J., Langin, D., and Fajas, L. (2010). Cyclin G2 regulates adipogenesis through PPAR gamma coactivation. *Endocrinology* 151, 5247-5254.
- Akasaka, T., Kanno, M., Balling, R., Mieza, M.A., Taniguchi, M., and Koseki, H. (1996). A role for mel-18, a Polycomb group-related vertebrate gene, during theaneroposterior specification of the axial skeleton. *Development* 122, 1513-1522.
- Akashi, K., He, X., Chen, J., Iwasaki, H., Niu, C., Steenhard, B., Zhang, J., Haug, J., and Li, L. (2003). Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. *Blood* 101, 383-389.
- Alchanati, I., Teicher, C., Cohen, G., Shemesh, V., Barr, H.M., Nakache, P., Ben-Avraham, D., Idelevich, A., Angel, I., Livnah, N., *et al.* (2009). The E3 ubiquitin-ligase Bmi1/Ring1A controls the proteasomal degradation of Top2alpha cleavage complex - a potentially new drug target. *PLoS One* 4, e8104.
- Alkema, M.J., Bronk, M., Verhoeven, E., Otte, A., van 't Veer, L.J., Berns, A., and van Lohuizen, M. (1997). Identification of Bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mammalian polycomb complex. *Genes & development* 11, 226-240.
- Alkema, M.J., van der Lugt, N.M., Bobeldijk, R.C., Berns, A., and van Lohuizen, M. (1995). Transformation of axial skeleton due to overexpression of bmi-1 in transgenic mice. *Nature* 374, 724-727.
- Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jorgensen, H.F., John, R.M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merkenschlager, M., *et al.* (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* 8, 532-538.
- Bardot, E.S., Valdes, V.J., Zhang, J., Perdigoto, C.N., Nicolis, S., Hearn, S.A., Silva, J.M., and Ezhkova, E. (2013). Polycomb subunits Ezh1 and Ezh2 regulate the Merkel cell differentiation program in skin stem cells. *The EMBO journal* 32, 1990-2000.
- Barthelmé, E. (1981). Histoire de la notion du cancer. *Histoire des Sciences médicales* 15, 167-172.
- Basu, A. (2003). Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *J Cell Mol Med* 7, 341-350.
- Baylin, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino, P.M., and Issa, J.P. (1998). Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72, 141-196.
- Bea, S., Tort, F., Pinyol, M., Puig, X., Hernandez, L., Hernandez, S., Fernandez, P.L., van Lohuizen, M., Colomer, D., and Campo, E. (2001). BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer research* 61, 2409-2412.
- Belardelli, F., Ferrantini, M., Proietti, E., and Kirkwood, J.M. (2002). Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 119-134.
- Bellodi, C., Lidonnici, M.R., Hamilton, A., Helgason, G.V., Soliera, A.R., Ronchetti, M., Galavotti, S., Young, K.W., Selmi, T., Yacobi, R., *et al.* (2009). Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *The Journal of clinical investigation* 119, 1109-1123.

- Ben-Neriah, Y., Daley, G.Q., Mes-Masson, A.M., Witte, O.N., and Baltimore, D. (1986). The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* 233, 212-214.
- Benoit, Y.D., Lepage, M.B., Khalfaoui, T., Tremblay, E., Basora, N., Carrier, J.C., Gudas, L.J., and Beaulieu, J.F. (2012). Polycomb repressive complex 2 impedes intestinal cell terminal differentiation. *J Cell Sci* 125, 3454-3463.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006a). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.
- Bernstein, E., Duncan, E.M., Masui, O., Gil, J., Heard, E., and Allis, C.D. (2006b). Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Molecular and cellular biology* 26, 2560-2569.
- Bhattacharyya, J., Mihara, K., Yasunaga, S., Tanaka, H., Hoshi, M., Takihara, Y., and Kimura, A. (2009). BMI-1 expression is enhanced through transcriptional and posttranscriptional regulation during the progression of chronic myeloid leukemia. *Ann Hematol* 88, 333-340.
- Binder, M., Roberts, C., Spencer, N., Antoine, D., and Cartwright, C. (2014). On the antiquity of cancer: evidence for metastatic carcinoma in a young man from ancient Nubia (c. 1200 BC). *PLoS One* 9, e90924.
- Boukarabila, H., Saurin, A.J., Batsche, E., Mossadegh, N., van Lohuizen, M., Otte, A.P., Pradel, J., Muchardt, C., Sieweke, M., and Duprez, E. (2009). The PRC1 Polycomb group complex interacts with PLZF/RARA to mediate leukemic transformation. *Genes & development* 23, 1195-1206.
- Boulay, G., Dubuissez, M., Van Rechem, C., Forget, A., Helin, K., Ayrault, O., and Leprince, D. (2012). Hypermethylated in cancer 1 (HIC1) recruits polycomb repressive complex 2 (PRC2) to a subset of its target genes through interaction with human polycomb-like (hPCL) proteins. *The Journal of biological chemistry* 287, 10509-10524.
- Bruggeman, S.W., Valk-Lingbeek, M.E., van der Stoop, P.P., Jacobs, J.J., Kieboom, K., Tanger, E., Hulsman, D., Leung, C., Arsenijevic, Y., Marino, S., *et al.* (2005). Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes & development* 19, 1438-1443.
- Buchwald, G., van der Stoop, P., Weichenrieder, O., Perrakis, A., van Lohuizen, M., and Sixma, T.K. (2006). Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J* 25, 2465-2474.
- Calao, M., Sekyere, E.O., Cui, H.J., Cheung, B.B., Thomas, W.D., Keating, J., Chen, J.B., Raif, A., Jankowski, K., Davies, N.P., *et al.* (2013). Direct effects of Bmi1 on p53 protein stability inactivates oncoprotein stress responses in embryonal cancer precursor cells at tumor initiation. *Oncogene* 32, 3616-3626.
- Cao, Q., Yu, J., Dhanasekaran, S.M., Kim, J.H., Mani, R.S., Tomlins, S.A., Mehra, R., Laxman, B., Cao, X., Kleer, C.G., *et al.* (2008). Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene* 27, 7274-7284.
- Cao, R., Tsukada, Y., and Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* 20, 845-854.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298, 1039-1043.
- Cao, R., and Zhang, Y. (2004a). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Current opinion in genetics & development* 14, 155-164.
- Cao, R., and Zhang, Y. (2004b). SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Molecular cell* 15, 57-67.

Cenci, T., Martini, M., Montano, N., D'Alessandris, Q.G., Falchetti, M.L., Annibali, D., Savino, M., Bianchi, F., Pierconti, F., Nasi, S., *et al.* (2012). Prognostic relevance of c-Myc and BMI1 expression in patients with glioblastoma. *Am J Clin Pathol* 138, 390-396.

Chagraoui, J., Hebert, J., Girard, S., and Sauvageau, G. (2011). An anticlastogenic function for the Polycomb Group gene Bmi1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5284-5289.

Chatoo, W., Abdouh, M., David, J., Champagne, M.P., Ferreira, J., Rodier, F., and Bernier, G. (2009). The polycomb group gene Bmi1 regulates antioxidant defenses in neurons by repressing p53 pro-oxidant activity. *J Neurosci* 29, 529-542.

Chen, J.Q., Liu, C.J., Wen, H.X., Shi, C.L., Zhang, H.S., Li, M., and Sun, G.G. (2014a). Changes in the expression of cyclin G2 in esophageal cancer cell and its significance. *Tumour Biol* 35, 3355-3362.

Chen, Z., Forman, L.W., Williams, R.M., and Faller, D.V. (2014b). Protein kinase C-delta inactivation inhibits the proliferation and survival of cancer stem cells in culture and in vivo. *BMC Cancer* 14, 90.

Chomel, J.C., Bonnet, M.L., Sorel, N., Bertrand, A., Meunier, M.C., Fichelson, S., Melkus, M., Bennaceur-Griscelli, A., Guilhot, F., and Turhan, A.G. (2011). Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease. *Blood* 118, 3657-3660.

Chou, D.M., Adamson, B., Dephoure, N.E., Tan, X., Nottke, A.C., Hurov, K.E., Gygi, S.P., Colaiacovo, M.P., and Elledge, S.J. (2010). A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 18475-18480.

Chowdhury, M., Mihara, K., Yasunaga, S., Ohtaki, M., Takihara, Y., and Kimura, A. (2007). Expression of Polycomb-group (PcG) protein BMI-1 predicts prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 21, 1116-1122.

Chu, S., Li, L., Singh, H., and Bhatia, R. (2007). BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia. *Cancer research* 67, 7045-7053.

Colicelli, J. (2010). ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. *Sci Signal* 3, re6.

Colosetti, P., Puissant, A., Robert, G., Luciano, F., Jacquell, A., Gounon, P., Cassuto, J.P., and Auberger, P. (2009). Autophagy is an important event for megakaryocytic differentiation of the chronic myelogenous leukemia K562 cell line. *Autophagy* 5, 1092-1098.

Comet, I., and Helin, K. (2014). Revolution in the Polycomb hierarchy. *Nat Struct Mol Biol* 21, 573-575.

Copland, M., Hamilton, A., Elrick, L.J., Baird, J.W., Allan, E.K., Jordanides, N., Barow, M., Mountford, J.C., and Holyoake, T.L. (2006). Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood* 107, 4532-4539.

Corbin, A.S., Agarwal, A., Loriaux, M., Cortes, J., Deininger, M.W., and Druker, B.J. (2011). Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *The Journal of clinical investigation* 121, 396-409.

Corso, A., Lazzarino, M., Morra, E., Merante, S., Astori, C., Bernasconi, P., Boni, M., and Bernasconi, C. (1995). Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation--a retrospective study of 443 patients. *Ann Hematol* 70, 79-82.

Cortes, J.E., Kantarjian, H.M., Brummendorf, T.H., Kim, D.W., Turkina, A.G., Shen, Z.X., Pasquini, R., Khoury, H.J., Arkin, S., Volkert, A., *et al.* (2011). Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood* 118, 4567-4576.

- Cortes, J.E., Kim, D.W., Pinilla-Ibarz, J., le Coutre, P., Paquette, R., Chuah, C., Nicolini, F.E., Apperley, J.F., Khoury, H.J., Talpaz, M., *et al.* (2013). A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 369, 1783-1796.
- Cortez, D., Reuther, G., and Pendergast, A.M. (1997). The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene* 15, 2333-2342.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., and Pirrotta, V. (2002). Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111, 185-196.
- Danhauser-Riedl, S., Warmuth, M., Druker, B.J., Emmerich, B., and Hallek, M. (1996). Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells. *Cancer research* 56, 3589-3596.
- Datta, S., Hoenerhoff, M.J., Bommi, P., Sainger, R., Guo, W.J., Dimri, M., Band, H., Band, V., Green, J.E., and Dimri, G.P. (2007). Bmi-1 cooperates with H-Ras to transform human mammary epithelial cells via dysregulation of multiple growth-regulatory pathways. *Cancer research* 67, 10286-10295.
- Davis, F.P., and Eddy, S.R. (2013). Transcription factors that convert adult cell identity are differentially polycomb repressed. *PLoS One* 8, e63407.
- de Napoles, M., Mermoud, J.E., Wakao, R., Tang, Y.A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T.B., Silva, J., Otte, A.P., Vidal, M., *et al.* (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* 7, 663-676.
- del Mar Lorente, M., Marcos-Gutierrez, C., Perez, C., Schoorlemmer, J., Ramirez, A., Magin, T., and Vidal, M. (2000). Loss- and gain-of-function mutations show a polycomb group function for Ring1A in mice. *Development* 127, 5093-5100.
- Dellino, G.I., Schwartz, Y.B., Farkas, G., McCabe, D., Elgin, S.C., and Pirrotta, V. (2004). Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Molecular cell* 13, 887-893.
- Deschamps, J., and Meijlink, F. (1992). Mammalian homeobox genes in normal development and neoplasia. *Crit Rev Oncog* 3, 117-173.
- Di Croce, L., and Helin, K. (2013). Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol* 20, 1147-1155.
- Dierks, C., Beigi, R., Guo, G.R., Zirlik, K., Stegert, M.R., Manley, P., Trussell, C., Schmitt-Graeff, A., Landwerlin, K., Veelken, H., *et al.* (2008). Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell* 14, 238-249.
- Dietrich, N., Lerdrup, M., Landt, E., Agrawal-Singh, S., Bak, M., Tommerup, N., Rappsilber, J., Sodersten, E., and Hansen, K. (2012). REST-mediated recruitment of polycomb repressor complexes in mammalian cells. *PLoS Genet* 8, e1002494.
- Dimmeler, S., Breitschopf, K., Haendeler, J., and Zeiher, A.M. (1999). Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med* 189, 1815-1822.
- Dimri, M., Carroll, J.D., Cho, J.H., and Dimri, G.P. (2013). microRNA-141 regulates BMI1 expression and induces senescence in human diploid fibroblasts. *Cell Cycle* 12, 3537-3546.
- Donato, N.J., Wu, J.Y., Stapley, J., Gallick, G., Lin, H., Arlinghaus, R., and Talpaz, M. (2003). BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 101, 690-698.
- Dong, Q., Sharma, S., Liu, H., Chen, L., Gu, B., Sun, X., and Wang, G. (2014). HDAC inhibitors reverse acquired radio resistance of KYSE-150R esophageal carcinoma cells by modulating Bmi-1 expression. *Toxicol Lett* 224, 121-129.

- Doughty-Shenton, D., Joseph, J.D., Zhang, J., Pagliarini, D.J., Kim, Y., Lu, D., Dixon, J.E., and Casey, P.J. (2010). Pharmacological targeting of the mitochondrial phosphatase PTPMT1. *J Pharmacol Exp Ther* 333, 584-592.
- Dovey, J.S., Zacharek, S.J., Kim, C.F., and Lees, J.A. (2008). Bmi1 is critical for lung tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11857-11862.
- Druker, B.J. (2008). Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 112, 4808-4817.
- Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., *et al.* (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355, 2408-2417.
- Druker, B.J., and Lydon, N.B. (2000). Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *The Journal of clinical investigation* 105, 3-7.
- Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, D.J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J.M., Lydon, N.B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., *et al.* (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344, 1031-1037.
- Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon, N.B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2, 561-566.
- Eissenberg, J.C. (2001). Molecular biology of the chromo domain: an ancient chromatin module comes of age. *Gene* 275, 19-29.
- Ernst, T., Score, J., Deininger, M., Hidalgo-Curtis, C., Lackie, P., Ershler, W.B., Goldman, J.M., Cross, N.C., and Grand, F. (2011). Identification of FOXP1 and SNX2 as novel ABL1 fusion partners in acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology* 153, 43-46.
- Ertmer, A., Huber, V., Gilch, S., Yoshimori, T., Erfle, V., Duyster, J., Elsasser, H.P., and Schatzl, H.M. (2007). The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia* 21, 936-942.
- Essers, M.A., Offner, S., Blanco-Bose, W.E., Waibler, Z., Kalinke, U., Duchosal, M.A., and Trumpp, A. (2009). IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 458, 904-908.
- Ezhkova, E., Lien, W.H., Stokes, N., Pasolli, H.A., Silva, J.M., and Fuchs, E. (2011). EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair. *Genes & development* 25, 485-498.
- Ezhkova, E., Pasolli, H.A., Parker, J.S., Stokes, N., Su, I.H., Hannon, G., Tarakhovsky, A., and Fuchs, E. (2009). Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. *Cell* 136, 1122-1135.
- Facchino, S., Abdouh, M., Chatoo, W., and Bernier, G. (2010). BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J Neurosci* 30, 10096-10111.
- Farivar, S., Zati Keikha, R., Shiari, R., and Jadali, F. (2013). Expression of bmi-1 in pediatric brain tumors as a new independent prognostic marker of patient survival. *Biomed Res Int* 2013, 192548.
- Faust, C., Schumacher, A., Holdener, B., and Magnuson, T. (1995). The eed mutation disrupts anterior mesoderm production in mice. *Development* 121, 273-285.
- Fialkow, P.J., Jacobson, R.J., and Papayannopoulou, T. (1977). Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* 63, 125-130.

Finnerty, J.R., and Martindale, M.Q. (1998). The evolution of the Hox cluster: insights from outgroups. *Curr Opin Genet Dev* 8, 681-687.

Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D., and Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* 17, 1870-1881.

Flamant, S., Kortulewski, T., Dugray, A., Bonnet, M.L., Guillier, M., Guilhot, F., Bourhis, J.H., Vainchenker, W., Tronik-Le Roux, D., and Turhan, A.G. (2005). Osteopontin is upregulated by BCR-ABL. *Biochemical and biophysical research communications* 333, 1378-1384.

Francis, N.J., and Kingston, R.E. (2001). Mechanisms of transcriptional memory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 409-421.

Francis, N.J., Kingston, R.E., and Woodcock, C.L. (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* 306, 1574-1577.

Fujimura, A., Michiue, H., Cheng, Y., Uneda, A., Tani, Y., Nishiki, T., Ichikawa, T., Wei, F.Y., Tomizawa, K., and Matsui, H. (2013). Cyclin G2 promotes hypoxia-driven local invasion of glioblastoma by orchestrating cytoskeletal dynamics. *Neoplasia* 15, 1272-1281.

Gambacorti-Passerini, C., Barni, R., le Coutre, P., Zucchetti, M., Cabrita, G., Cleris, L., Rossi, F., Gianazza, E., Brueggen, J., Cozens, R., *et al.* (2000). Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst* 92, 1641-1650.

Gamerding, M., Hajieva, P., Kaya, A.M., Wolfrum, U., Hartl, F.U., and Behl, C. (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *The EMBO journal* 28, 889-901.

Gao, Z., Zhang, J., Bonasio, R., Strino, F., Sawai, A., Parisi, F., Kluger, Y., and Reinberg, D. (2012). PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Molecular cell* 45, 344-356.

Gaymes, T.J., Mufti, G.J., and Rassool, F.V. (2002). Myeloid leukemias have increased activity of the nonhomologous end-joining pathway and concomitant DNA misrepair that is dependent on the Ku70/86 heterodimer. *Cancer research* 62, 2791-2797.

Gearhart, M.D., Corcoran, C.M., Wamstad, J.A., and Bardwell, V.J. (2006). Polycomb group and SCF ubiquitin ligases are found in a novel BCOR complex that is recruited to BCL6 targets. *Molecular and cellular biology* 26, 6880-6889.

Gieni, R.S., Ismail, I.H., Campbell, S., and Hendzel, M.J. (2011). Polycomb group proteins in the DNA damage response: a link between radiation resistance and "stemness". *Cell Cycle* 10, 883-894.

Gil, J., and Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 667-677.

Gioia, R., Leroy, C., Drullion, C., Lagarde, V., Etienne, G., Dulucq, S., Lippert, E., Roche, S., Mahon, F.X., and Pasquet, J.M. (2011). Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells. *Blood* 118, 2211-2221.

Gishizky, M.L., Cortez, D., and Pendergast, A.M. (1995). Mutant forms of growth factor-binding protein-2 reverse BCR-ABL-induced transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10889-10893.

Godlewski, J., Nowicki, M.O., Bronisz, A., Williams, S., Otsuki, A., Nuovo, G., Raychaudhury, A., Newton, H.B., Chiocca, E.A., and Lawler, S. (2008). Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer research* 68, 9125-9130.

- Gorre, M.E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N., and Sawyers, C.L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293, 876-880.
- Goussetis, D.J., Gounaris, E., Wu, E.J., Vakana, E., Sharma, B., Bogyo, M., Altman, J.K., and Platanias, L.C. (2012). Autophagic degradation of the BCR-ABL oncoprotein and generation of antileukemic responses by arsenic trioxide. *Blood* 120, 3555-3562.
- Graham, S.M., Jorgensen, H.G., Allan, E., Pearson, C., Alcorn, M.J., Richmond, L., and Holyoake, T.L. (2002). Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99, 319-325.
- Grosso, S., Puissant, A., Dufies, M., Colosetti, P., Jacquel, A., Lebrigand, K., Barbry, P., Deckert, M., Cassuto, J.P., Mari, B., *et al.* (2009). Gene expression profiling of imatinib and PD166326-resistant CML cell lines identifies Fyn as a gene associated with resistance to BCR-ABL inhibitors. *Mol Cancer Ther* 8, 1924-1933.
- Gunster, M.J., Satijn, D.P., Hamer, K.M., den Blaauwen, J.L., de Bruijn, D., Alkema, M.J., van Lohuizen, M., van Driel, R., and Otte, A.P. (1997). Identification and characterization of interactions between the vertebrate polycomb-group protein BMI1 and human homologs of polyhomeotic. *Molecular and cellular biology* 17, 2326-2335.
- Guo, L., Huang, J.X., Liu, Y., Li, X., Zhou, S.R., Qian, S.W., Zhu, H., Huang, H.Y., Dang, Y.J., and Tang, Q.Q. (2013). Transactivation of Atg4b by C/EBPbeta promotes autophagy to facilitate adipogenesis. *Molecular and cellular biology* 33, 3180-3190.
- Guo, W.J., Datta, S., Band, V., and Dimri, G.P. (2007). Mel-18, a polycomb group protein, regulates cell proliferation and senescence via transcriptional repression of Bmi-1 and c-Myc oncoproteins. *Molecular biology of the cell* 18, 536-546.
- Gustafson, W.C., Ray, S., Jamieson, L., Thompson, E.A., Brasier, A.R., and Fields, A.P. (2004). Bcr-Abl regulates protein kinase C α (PKC α) transcription via an Elk1 site in the PKC α promoter. *The Journal of biological chemistry* 279, 9400-9408.
- Haga, K., Ohno, S., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Fujita, M., Sakamoto, M., Galloway, D.A., and Kiyono, T. (2007). Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci* 98, 147-154.
- Hanson, R.D., Hess, J.L., Yu, B.D., Ernst, P., van Lohuizen, M., Berns, A., van der Lugt, N.M., Shashikant, C.S., Ruddle, F.H., Seto, M., *et al.* (1999). Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14372-14377.
- Harada, Y., Inoue, D., Ding, Y., Imagawa, J., Doki, N., Matsui, H., Yahata, T., Matsushita, H., Ando, K., Sashida, G., *et al.* (2013). RUNX1/AML1 mutant collaborates with BMI1 overexpression in the development of human and murine myelodysplastic syndromes. *Blood* 121, 3434-3446.
- Harb, J.G., Neviani, P., Chyla, B.J., Ellis, J.J., Ferencak, G.J., Oaks, J.J., Walker, C.J., Hokland, P., Roy, D.C., Caligiuri, M.A., *et al.* (2013). Bcl-xL anti-apoptotic network is dispensable for development and maintenance of CML but is required for disease progression where it represents a new therapeutic target. *Leukemia* 27, 1996-2005.
- Haupt, Y., Alexander, W.S., Barri, G., Klinken, S.P., and Adams, J.M. (1991). Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell* 65, 753-763.
- Hayry, V., Tanner, M., Blom, T., Tynnenen, O., Roselli, A., Ollikainen, M., Sariola, H., Wartiovaara, K., and Nupponen, N.N. (2008). Copy number alterations of the polycomb gene BMI1 in gliomas. *Acta Neuropathol* 116, 97-102.
- Heisterkamp, N., and Groffen, J. (2002). Philadelphia-positive leukemia: a personal perspective. *Oncogene* 21, 8536-8540.

- Helin, K., and Dhanak, D. (2013). Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature* 502, 480-488.
- Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P., and Allis, C.D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348-360.
- Hernandez-Boluda, J.C., Cervantes, F., Colomer, D., Vela, M.C., Costa, D., Paz, M.F., Esteller, M., and Montserrat, E. (2003). Genomic p16 abnormalities in the progression of chronic myeloid leukemia into blast crisis: a sequential study in 42 patients. *Exp Hematol* 31, 204-210.
- Herz, H.M., and Shilatifard, A. (2010). The JARID2-PRC2 duality. *Genes & development* 24, 857-861.
- Hoelbl, A., Schuster, C., Kovacic, B., Zhu, B., Wickre, M., Hoelzl, M.A., Fajmann, S., Grebien, F., Warsch, W., Stengl, G., *et al.* (2010). Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO Mol Med* 2, 98-110.
- Hoenerhoff, M.J., Chu, I., Barkan, D., Liu, Z.Y., Datta, S., Dimri, G.P., and Green, J.E. (2009). BMI1 cooperates with H-RAS to induce an aggressive breast cancer phenotype with brain metastases. *Oncogene* 28, 3022-3032.
- Hope, K.J., Jin, L., and Dick, J.E. (2004). Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 5, 738-743.
- Hsu, W.L., Preston, D.L., Soda, M., Sugiyama, H., Funamoto, S., Kodama, K., Kimura, A., Kamada, N., Dohy, H., Tomonaga, M., *et al.* (2013). The incidence of leukemia, lymphoma and multiple myeloma among atomic bomb survivors: 1950-2001. *Radiat Res* 179, 361-382.
- Huang, W.S., Metcalf, C.A., Sundaramoorthi, R., Wang, Y., Zou, D., Thomas, R.M., Zhu, X., Cai, L., Wen, D., Liu, S., *et al.* (2010). Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant. *Journal of medicinal chemistry* 53, 4701-4719.
- Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska, E., Sosman, J., McDermott, D., Bodrogi, I., *et al.* (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356, 2271-2281.
- Ismail, I.H., Gagne, J.P., Caron, M.C., McDonald, D., Xu, Z., Masson, J.Y., Poirier, G.G., and Hendzel, M.J. (2012). CBX4-mediated SUMO modification regulates BMI1 recruitment at sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res* 40, 5497-5510.
- Iwama, A., Oguro, H., Negishi, M., Kato, Y., Morita, Y., Tsukui, H., Ema, H., Kamijo, T., Katoh-Fukui, Y., Koseki, H., *et al.* (2004). Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* 21, 843-851.
- Jacobs, J.J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A., and van Lohuizen, M. (1999a). The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 397, 164-168.
- Jacobs, J.J., Scheijen, B., Voncken, J.W., Kieboom, K., Berns, A., and van Lohuizen, M. (1999b). Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes & development* 13, 2678-2690.
- Jagani, Z., Wiederschain, D., Loo, A., He, D., Mosher, R., Fordjour, P., Monahan, J., Morrissey, M., Yao, Y.M., Lengauer, C., *et al.* (2010). The Polycomb group protein Bmi-1 is essential for the growth of multiple myeloma cells. *Cancer research* 70, 5528-5538.
- Jiang, X., Zhao, Y., Smith, C., Gasparetto, M., Turhan, A., Eaves, A., and Eaves, C. (2007). Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia* 21, 926-935.

- Jin, L., Tabe, Y., Konoplev, S., Xu, Y., Leysath, C.E., Lu, H., Kimura, S., Ohsaka, A., Rios, M.B., Calvert, L., *et al.* (2008). CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol Cancer Ther* 7, 48-58.
- Joazeiro, C.A., and Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-552.
- Johansson, B., Fioretos, T., and Mitelman, F. (2002). Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* 107, 76-94.
- Jongen-Lavrencic, M., Salesse, S., Delwel, R., and Verfaillie, C.M. (2005). BCR/ABL-mediated downregulation of genes implicated in cell adhesion and motility leads to impaired migration toward CCR7 ligands CCL19 and CCL21 in primary BCR/ABL-positive cells. *Leukemia* 19, 373-380.
- Jorgensen, H.G., Allan, E.K., Jordanides, N.E., Mountford, J.C., and Holyoake, T.L. (2007). Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. *Blood* 109, 4016-4019.
- Junco, S.E., Wang, R., Gaipa, J.C., Taylor, A.B., Schirf, V., Gearhart, M.D., Bardwell, V.J., Demeler, B., Hart, P.J., and Kim, C.A. (2013). Structure of the polycomb group protein PCGF1 in complex with BCOR reveals basis for binding selectivity of PCGF homologs. *Structure* 21, 665-671.
- Kagey, M.H., Melhuish, T.A., and Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113, 127-137.
- Kamminga, L.M., Bystrykh, L.V., de Boer, A., Houwer, S., Douma, J., Weersing, E., Dontje, B., and de Haan, G. (2006). The Polycomb group gene *Ezh2* prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood* 107, 2170-2179.
- Kantarjian, H.M., Talpaz, M., Dhingra, K., Estey, E., Keating, M.J., Ku, S., Trujillo, J., Huh, Y., Stass, S., and Kurzrock, R. (1991). Significance of the P210 versus P190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute leukemia. *Blood* 78, 2411-2418.
- Kasukabe, T., Okabe-Kado, J., Kato, N., Sassa, T., and Honma, Y. (2005). Effects of combined treatment with rapamycin and cotylenin A, a novel differentiation-inducing agent, on human breast carcinoma MCF-7 cells and xenografts. *Breast Cancer Res* 7, R1097-1110.
- Kaur, S., Parmar, S., Smith, J., Katsoulidis, E., Li, Y., Sassano, A., Majchrzak, B., Uddin, S., Tallman, M.S., Fish, E.N., *et al.* (2005). Role of protein kinase C-delta (PKC-delta) in the generation of the effects of IFN-alpha in chronic myelogenous leukemia cells. *Exp Hematol* 33, 550-557.
- Ketel, C.S., Andersen, E.F., Vargas, M.L., Suh, J., Strome, S., and Simon, J.A. (2005). Subunit contributions to histone methyltransferase activities of fly and worm polycomb group complexes. *Molecular and cellular biology* 25, 6857-6868.
- Kheradmand Kia, S., Solaimani Kartalaei, P., Farahbakhshian, E., Pourfarzad, F., von Lindern, M., and Verrijzer, C.P. (2009). EZH2-dependent chromatin looping controls INK4a and INK4b, but not ARF, during human progenitor cell differentiation and cellular senescence. *Epigenetics Chromatin* 2, 16.
- Kim, C.A., Gingery, M., Pilpa, R.M., and Bowie, J.U. (2002). The SAM domain of polyhomeotic forms a helical polymer. *Nat Struct Biol* 9, 453-457.
- Kim, H., Kang, K., and Kim, J. (2009). AEBP2 as a potential targeting protein for Polycomb Repression Complex PRC2. *Nucleic Acids Res* 37, 2940-2950.
- Kim, J., Hwangbo, J., and Wong, P.K. (2011). p38 MAPK-Mediated Bmi-1 down-regulation and defective proliferation in ATM-deficient neural stem cells can be restored by Akt activation. *PLoS One* 6, e16615.
- Kim, J.H., Chu, S.C., Gramlich, J.L., Pride, Y.B., Babendreier, E., Chauhan, D., Salgia, R., Podar, K., Griffin, J.D., and Sattler, M. (2005). Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood* 105, 1717-1723.

- Kin, Y., Shibuya, M., and Maru, Y. (2001). Inhibition of protein kinase C delta has negative effect on anchorage-independent growth of BCR-ABL-transformed Rat1 cells. *Leuk Res* 25, 821-825.
- Klauke, K., and de Haan, G. (2011). Polycomb group proteins in hematopoietic stem cell aging and malignancies. *Int J Hematol* 94, 11-23.
- Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Kocher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M., and Muller, J. (2006). A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes & development* 20, 1110-1122.
- Komatsu, N., Watanabe, T., Uchida, M., Mori, M., Kirito, K., Kikuchi, S., Liu, Q., Tauchi, T., Miyazawa, K., Endo, H., *et al.* (2003). A member of Forkhead transcription factor FKHRL1 is a downstream effector of STI571-induced cell cycle arrest in BCR-ABL-expressing cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 6411-6419.
- Konig, H., Holyoake, T.L., and Bhatia, R. (2008). Effective and selective inhibition of chronic myeloid leukemia primitive hematopoietic progenitors by the dual Src/Abl kinase inhibitor SKI-606. *Blood* 111, 2329-2338.
- Kreso, A., van Galen, P., Pedley, N.M., Lima-Fernandes, E., Frelin, C., Davis, T., Cao, L., Baiazitov, R., Du, W., Sydorenko, N., *et al.* (2014). Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer. *Nat Med* 20, 29-36.
- Ku, M., Koche, R.P., Rheinbay, E., Mendenhall, E.M., Endoh, M., Mikkelsen, T.S., Presser, A., Nusbaum, C., Xie, X., Chi, A.S., *et al.* (2008). Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet* 4, e1000242.
- Laneuville, P. (1995). Abl tyrosine protein kinase. *Semin Immunol* 7, 255-266.
- Laneuville, P., Sun, G., Timm, M., and Vekemans, M. (1992). Clonal evolution in a myeloid cell line transformed to interleukin-3 independent growth by retroviral transduction and expression of p210bcr/abl. *Blood* 80, 1788-1797.
- Laurent, C.E., and Smithgall, T.E. (2004). The c-Fes tyrosine kinase cooperates with the breakpoint cluster region protein (Bcr) to induce neurite extension in a Rac- and Cdc42-dependent manner. *Exp Cell Res* 299, 188-198.
- Lee, K., Adhikary, G., Balasubramanian, S., Gopalakrishnan, R., McCormick, T., Dimri, G.P., Eckert, R.L., and Rorke, E.A. (2008). Expression of Bmi-1 in epidermis enhances cell survival by altering cell cycle regulatory protein expression and inhibiting apoptosis. *J Invest Dermatol* 128, 9-17.
- Lessard, J., Baban, S., and Sauvageau, G. (1998). Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells. *Blood* 91, 1216-1224.
- Lessard, J., and Sauvageau, G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423, 255-260.
- Levine, S.S., Weiss, A., Erdjument-Bromage, H., Shao, Z., Tempst, P., and Kingston, R.E. (2002). The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol Cell Biol* 22, 6070-6078.
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.
- Li, B., Zhou, J., Liu, P., Hu, J., Jin, H., Shimono, Y., Takahashi, M., and Xu, G. (2007). Polycomb protein Cbx4 promotes SUMO modification of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *Biochem J* 405, 369-378.
- Li, W.J., Liu, G.L., Yu, F., Xiang, X.X., Lu, Y.F., Xiao, H.Z., and Shi, Y.P. (2013). CCNG2 suppressor biological effects on thyroid cancer cell through promotion of CDK2 degradation. *Asian Pac J Cancer Prev* 14, 6165-6171.

Linger, R.M., Keating, A.K., Earp, H.S., and Graham, D.K. (2010). Taking aim at Mer and Axl receptor tyrosine kinases as novel therapeutic targets in solid tumors. *Expert Opin Ther Targets* 14, 1073-1090.

Liu, H., Lu, Z.G., Miki, Y., and Yoshida, K. (2007). Protein kinase C delta induces transcription of the TP53 tumor suppressor gene by controlling death-promoting factor Btf in the apoptotic response to DNA damage. *Molecular and cellular biology* 27, 8480-8491.

Liu, J., Cao, L., Chen, J., Song, S., Lee, I.H., Quijano, C., Liu, H., Keyvanfar, K., Chen, H., Cao, L.Y., *et al.* (2009). Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature* 459, 387-392.

Liu, Y., Liu, F., Yu, H., Zhao, X., Sashida, G., Deblasio, A., Harr, M., She, Q.B., Chen, Z., Lin, H.K., *et al.* (2012). Akt phosphorylates the transcriptional repressor bmi1 to block its effects on the tumor-suppressing ink4a-arf locus. *Sci Signal* 5, ra77.

Liu, Y., Sanchez-Tillo, E., Lu, X., Huang, L., Clem, B., Telang, S., Jenson, A.B., Cuatrecasas, M., Chesney, J., Postigo, A., *et al.* (2014). The ZEB1 transcription factor acts in a negative feedback loop with miR200 downstream of Ras and Rb1 to regulate Bmi1 expression. *The Journal of biological chemistry* 289, 4116-4125.

Louis, K., Guerinneau, N., Fromigue, O., Defamie, V., Collazos, A., Anglard, P., Shipp, M.A., Auberger, P., Joubert, D., and Mari, B. (2005). Tumor cell-mediated induction of the stromal factor stromelysin-3 requires heterotypic cell contact-dependent activation of specific protein kinase C isoforms. *The Journal of biological chemistry* 280, 1272-1283.

Luciano, F., Jacquet, A., Colosetti, P., Herrant, M., Cagnol, S., Pages, G., and Auberger, P. (2003). Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* 22, 6785-6793.

Lugo, T.G., Pendergast, A.M., Muller, A.J., and Witte, O.N. (1990). Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247, 1079-1082.

Luis, N.M., Morey, L., Mejetta, S., Pascual, G., Janich, P., Kuebler, B., Cozutto, L., Roma, G., Nascimento, E., Frye, M., *et al.* (2011). Regulation of human epidermal stem cell proliferation and senescence requires polycomb- dependent and -independent functions of Cbx4. *Cell Stem Cell* 9, 233-246.

Lukacs, R.U., Memarzadeh, S., Wu, H., and Witte, O.N. (2010). Bmi-1 is a crucial regulator of prostate stem cell self-renewal and malignant transformation. *Cell Stem Cell* 7, 682-693.

Lundell, B.I., McCarthy, J.B., Kovach, N.L., and Verfaillie, C.M. (1996). Activation-dependent alpha5beta1 integrin-mediated adhesion to fibronectin decreases proliferation of chronic myelogenous leukemia progenitors and K562 cells. *Blood* 87, 2450-2458.

Ly, C., Arechiga, A.F., Melo, J.V., Walsh, C.M., and Ong, S.T. (2003). Bcr-Abl kinase modulates the translation regulators ribosomal protein S6 and 4E-BP1 in chronic myelogenous leukemia cells via the mammalian target of rapamycin. *Cancer research* 63, 5716-5722.

Maertens, G.N., El Messaoudi-Aubert, S., Racek, T., Stock, J.K., Nicholls, J., Rodriguez-Niedenfuhr, M., Gil, J., and Peters, G. (2009). Several distinct polycomb complexes regulate and co-localize on the INK4a tumor suppressor locus. *PLoS One* 4, e6380.

Mahon, F.X., Deininger, M.W., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2000). Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 96, 1070-1079.

Mahon, F.X., Hayette, S., Lagarde, V., Belloc, F., Turcq, B., Nicolini, F., Belanger, C., Manley, P.W., Leroy, C., Etienne, G., *et al.* (2008). Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer research* 68, 9809-9816.

Mahon, F.X., Rea, D., Guilhot, J., Guilhot, F., Huguet, F., Nicolini, F., Legros, L., Charbonnier, A., Guerci, A., Varet, B., *et al.* (2010). Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have

maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* 11, 1029-1035.

Margueron, R., Li, G., Sarma, K., Blais, A., Zavadil, J., Woodcock, C.L., Dynlacht, B.D., and Reinberg, D. (2008). Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Molecular cell* 32, 503-518.

Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343-349.

Marshall, G.M., Gherardi, S., Xu, N., Neiron, Z., Trahair, T., Scarlett, C.J., Chang, D.K., Liu, P.Y., Jankowski, K., Iraci, N., *et al.* (2010). Transcriptional upregulation of histone deacetylase 2 promotes Myc-induced oncogenic effects. *Oncogene* 29, 5957-5968.

Martin, A., and Cano, A. (2010). Tumorigenesis: Twist1 links EMT to self-renewal. *Nat Cell Biol* 12, 924-925.

McGinnis, W., and Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.

McWhirter, J.R., Galasso, D.L., and Wang, J.Y. (1993). A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Molecular and cellular biology* 13, 7587-7595.

Melo, J.V. (1996). The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 88, 2375-2384.

Merkerova, M., Bruchova, H., Kracmarova, A., Klamova, H., and Brdicka, R. (2007). Bmi-1 over-expression plays a secondary role in chronic myeloid leukemia transformation. *Leuk Lymphoma* 48, 793-801.

Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A.Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., Shen, S., Kepp, O., Scoazec, M., Mignot, G., *et al.* (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 334, 1573-1577.

Michnick, S.W. (2006). The connectivity map. *Nat Chem Biol* 2, 663-664.

Mihara, K., Chowdhury, M., Nakaju, N., Hidani, S., Ihara, A., Hyodo, H., Yasunaga, S., Takihara, Y., and Kimura, A. (2006). Bmi-1 is useful as a novel molecular marker for predicting progression of myelodysplastic syndrome and patient prognosis. *Blood* 107, 305-308.

Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.K., Koche, R.P., *et al.* (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553-560.

Milano, V., Piao, Y., LaFortune, T., and de Groot, J. (2009). Dasatinib-induced autophagy is enhanced in combination with temozolomide in glioma. *Mol Cancer Ther* 8, 394-406.

Min, J., Zhang, Y., and Xu, R.M. (2003). Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev* 17, 1823-1828.

Mochizuki-Kashio, M., Mishima, Y., Miyagi, S., Negishi, M., Saraya, A., Konuma, T., Shinga, J., Koseki, H., and Iwama, A. (2011). Dependency on the polycomb gene Ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood* 118, 6553-6561.

Mohn, F., Weber, M., Rebhan, M., Roloff, T.C., Richter, J., Stadler, M.B., Bibel, M., and Schubeler, D. (2008). Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Molecular cell* 30, 755-766.

Mohty, M., Yong, A.S., Szydlo, R.M., Apperley, J.F., and Melo, J.V. (2007). The polycomb group BMI1 gene is a molecular marker for predicting prognosis of chronic myeloid leukemia. *Blood* 110, 380-383.

Molofsky, A.V., He, S., Bydon, M., Morrison, S.J., and Pardal, R. (2005). Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes & development* 19, 1432-1437.

- Molofsky, A.V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I.K., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* *425*, 962-967.
- Montaner, S., Perona, R., Saniger, L., and Lacal, J.C. (1998). Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *The Journal of biological chemistry* *273*, 12779-12785.
- Motzer, R.J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T.E., Porta, C., Bracarda, S., Grunwald, V., Thompson, J.A., Figlin, R.A., Hollaender, N., *et al.* (2008). Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* *372*, 449-456.
- Muller, J., Gaunt, S., and Lawrence, P.A. (1995). Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development* *121*, 2847-2852.
- Muller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E., and Simon, J.A. (2002). Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* *111*, 197-208.
- Nacerddine, K., Beaudry, J.B., Ginjala, V., Westerman, B., Mattioli, F., Song, J.Y., van der Poel, H., Ponz, O.B., Pritchard, C., Cornelissen-Steijger, P., *et al.* (2012). Akt-mediated phosphorylation of Bmi1 modulates its oncogenic potential, E3 ligase activity, and DNA damage repair activity in mouse prostate cancer. *The Journal of clinical investigation* *122*, 1920-1932.
- Nagy, E., Beck, Z., Kiss, A., Csoma, E., Telek, B., Konya, J., Olah, E., Rak, K., and Toth, F.D. (2003). Frequent methylation of p16INK4A and p14ARF genes implicated in the evolution of chronic myeloid leukaemia from its chronic to accelerated phase. *Eur J Cancer* *39*, 2298-2305.
- Nakamura, S., Oshima, M., Yuan, J., Saraya, A., Miyagi, S., Konuma, T., Yamazaki, S., Osawa, M., Nakauchi, H., Koseki, H., *et al.* (2012). Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells. *PLoS One* *7*, e36209.
- Negishi, M., Saraya, A., Miyagi, S., Nagao, K., Inagaki, Y., Nishikawa, M., Tajima, S., Koseki, H., Tsuda, H., Takasaki, Y., *et al.* (2007). Bmi1 cooperates with Dnmt1-associated protein 1 in gene silencing. *Biochemical and biophysical research communications* *353*, 992-998.
- Nekrasov, M., Klymenko, T., Fraterman, S., Papp, B., Oktaba, K., Kocher, T., Cohen, A., Stunnenberg, H.G., Wilm, M., and Muller, J. (2007). Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *The EMBO journal* *26*, 4078-4088.
- Nichols, G.L., Raines, M.A., Vera, J.C., Lacomis, L., Tempst, P., and Golde, D.W. (1994). Identification of CRKL as the constitutively phosphorylated 39-kD tyrosine phosphoprotein in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood* *84*, 2912-2918.
- Nishiyama, A., Xin, L., Sharov, A.A., Thomas, M., Mowrer, G., Meyers, E., Piao, Y., Mehta, S., Yee, S., Nakatake, Y., *et al.* (2009). Uncovering early response of gene regulatory networks in ESCs by systematic induction of transcription factors. *Cell Stem Cell* *5*, 420-433.
- Nomura, M., Takihara, Y., and Shimada, K. (1994). Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: one of the early inducible clones encodes a novel protein sharing several highly homologous regions with a Drosophila polyhomeotic protein. *Differentiation* *57*, 39-50.
- Nowak, K., Kerl, K., Fehr, D., Kramps, C., Gessner, C., Killmer, K., Samans, B., Berwanger, B., Christiansen, H., and Lutz, W. (2006). BMI1 is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas. *Nucleic Acids Res* *34*, 1745-1754.
- O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S.C., Surani, M.A., and Jenuwein, T. (2001). The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Molecular and cellular biology* *21*, 4330-4336.
- O'Dwyer, M.E., and Druker, B.J. (2000). STI571: an inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase for the treatment of chronic myelogenous leukaemia. *Lancet Oncol* *1*, 207-211.

- Oguro, H., Yuan, J., Ichikawa, H., Ikawa, T., Yamazaki, S., Kawamoto, H., Nakauchi, H., and Iwama, A. (2010). Poised lineage specification in multipotential hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi1. *Cell Stem Cell* 6, 279-286.
- Olavarria, E., Ottmann, O.G., Deininger, M., Clark, R.E., Bandini, G., Byrne, J., Lipton, J., Vitek, A., Michallet, M., Siegert, W., *et al.* (2003). Response to imatinib in patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 17, 1707-1712.
- Ozpolat, B., Akar, U., Mehta, K., and Lopez-Berestein, G. (2007). PKC delta and tissue transglutaminase are novel inhibitors of autophagy in pancreatic cancer cells. *Autophagy* 3, 480-483.
- Pan, M.R., Peng, G., Hung, W.C., and Lin, S.Y. (2011). Monoubiquitination of H2AX protein regulates DNA damage response signaling. *The Journal of biological chemistry* 286, 28599-28607.
- Pane, F., Frigeri, F., Sindona, M., Luciano, L., Ferrara, F., Cimino, R., Meloni, G., Saglio, G., Salvatore, F., and Rotoli, B. (1996). Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 88, 2410-2414.
- Park, I.K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M.W., Pihalja, M., Weissman, I.L., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 302-305.
- Pasini, D., Bracken, A.P., Jensen, M.R., Lazzerini Denchi, E., and Helin, K. (2004). Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *The EMBO journal* 23, 4061-4071.
- Pereira-Caro, G., Mateos, R., Traka, M.H., Bacon, J.R., Bongaerts, R., Sarria, B., Bravo, L., and Kroon, P.A. (2013). Hydroxytyrosyl ethyl ether exhibits stronger intestinal anticarcinogenic potency and effects on transcript profiles compared to hydroxytyrosol. *Food Chem* 138, 1172-1182.
- Pereira, J.D., Sansom, S.N., Smith, J., Dobenecker, M.W., Tarakhovsky, A., and Livesey, F.J. (2010). Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15957-15962.
- Preudhomme, C., Guilhot, J., Nicolini, F.E., Guerci-Bresler, A., Rigal-Huguet, F., Maloisel, F., Coiteux, V., Gardembas, M., Berthou, C., Vekhoff, A., *et al.* (2010). Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 363, 2511-2521.
- Puissant, A., Dufies, M., Fenouille, N., Ben Sahra, I., Jacquiel, A., Robert, G., Cluzeau, T., Deckert, M., Tichet, M., Cheli, Y., *et al.* (2012). Imatinib triggers mesenchymal-like conversion of CML cells associated with increased aggressiveness. *J Mol Cell Biol* 4, 207-220.
- Puissant, A., Robert, G., Fenouille, N., Luciano, F., Cassuto, J.P., Raynaud, S., and Auberger, P. (2010). Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer research* 70, 1042-1052.
- Qian, T., Lee, J.Y., Park, J.H., Kim, H.J., and Kong, G. (2010). Id1 enhances RING1b E3 ubiquitin ligase activity through the Mel-18/Bmi-1 polycomb group complex. *Oncogene* 29, 5818-5827.
- Qiao, B., Chen, Z., Hu, F., Tao, Q., and Lam, A.K. (2013). BMI-1 activation is crucial in hTERT-induced epithelial-mesenchymal transition of oral epithelial cells. *Exp Mol Pathol* 95, 57-61.
- Raitano, A.B., Halpern, J.R., Hambuch, T.M., and Sawyers, C.L. (1995). The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11746-11750.
- Reddiconto, G., Toto, C., Palama, I., De Leo, S., de Luca, E., De Matteis, S., Dini, L., Passerini, C.G., Di Renzo, N., Maffia, M., *et al.* (2012). Targeting of GSK3beta promotes imatinib-mediated apoptosis in quiescent CD34+ chronic myeloid leukemia progenitors, preserving normal stem cells. *Blood* 119, 2335-2345.

- Remsing Rix, L.L., Rix, U., Colinge, J., Hantschel, O., Bennett, K.L., Stranzl, T., Muller, A., Baumgartner, C., Valent, P., Augustin, M., *et al.* (2009). Global target profile of the kinase inhibitor bosutinib in primary chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* 23, 477-485.
- Ringrose, L., and Paro, R. (2004). Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* 38, 413-443.
- Rizo, A., Horton, S.J., Olthof, S., Dontje, B., Ausema, A., van Os, R., van den Boom, V., Vellenga, E., de Haan, G., and Schuringa, J.J. (2010). BMI1 collaborates with BCR-ABL in leukemic transformation of human CD34+ cells. *Blood* 116, 4621-4630.
- Rizo, A., Olthof, S., Han, L., Vellenga, E., de Haan, G., and Schuringa, J.J. (2009). Repression of BMI1 in normal and leukemic human CD34(+) cells impairs self-renewal and induces apoptosis. *Blood* 114, 1498-1505.
- Robert, G., Ben Sahra, I., Puissant, A., Colosetti, P., Belhacene, N., Gounon, P., Hofman, P., Bost, F., Cassuto, J.P., and Auberger, P. (2009). Acadesine kills chronic myelogenous leukemia (CML) cells through PKC-dependent induction of autophagic cell death. *PLoS One* 4, e7889.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* 273, 5858-5868.
- Rosenfeld, M.R., Ye, X., Supko, J.G., Desideri, S., Grossman, S.A., Brem, S., Mikkelsen, T., Wang, D., Chang, Y.C., Hu, J., *et al.* (2014). A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Autophagy* 10, 1359-1368.
- Rosilio, C., Ben-Sahra, I., Bost, F., and Peyron, J.F. (2014). Metformin: a metabolic disruptor and anti-diabetic drug to target human leukemia. *Cancer Lett* 346, 188-196.
- Ross, D.M., Branford, S., Seymour, J.F., Schwarzer, A.P., Arthur, C., Yeung, D.T., Dang, P., Goyne, J.M., Slader, C., Filshie, R.J., *et al.* (2013). Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood* 122, 515-522.
- Ross, J., Mavoungou, L., Bresnick, E.H., and Milot, E. (2012). GATA-1 utilizes Ikaros and polycomb repressive complex 2 to suppress Hes1 and to promote erythropoiesis. *Molecular and cellular biology* 32, 3624-3638.
- Rothbart, S.B., and Strahl, B.D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta* 1839, 627-643.
- Rothermund, C.A., Gopalakrishnan, V.K., Eudy, J.D., and Vishwanatha, J.K. (2005). Casodex treatment induces hypoxia-related gene expression in the LNCaP prostate cancer progression model. *BMC Urol* 5, 5.
- Rouhgharabaei, L., Ferreira, J.F., Put, N., Michaux, L., Tousseyn, T., Lefebvre, C., Gardiner, A., De Keler, W., Demuyne, H., Verschuere, J., *et al.* (2013). BMI1, the polycomb-group gene, is recurrently targeted by genomic rearrangements in progressive B-cell leukemia/lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 52, 928-944.
- Rousselot, P., Huguet, F., Rea, D., Legros, L., Cayuela, J.M., Maarek, O., Blanchet, O., Marit, G., Gluckman, E., Reiffers, J., *et al.* (2007). Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood* 109, 58-60.
- Rowley, J.D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290-293.
- Sahasrabudhe, A.A., Dimri, M., Bommi, P.V., and Dimri, G.P. (2011). betaTrCP regulates BMI1 protein turnover via ubiquitination and degradation. *Cell Cycle* 10, 1322-1330.
- Sattler, M., Mohi, M.G., Pride, Y.B., Quinnan, L.R., Malouf, N.A., Podar, K., Gesbert, F., Iwasaki, H., Li, S., Van Etten, R.A., *et al.* (2002). Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* 1, 479-492.

- Sattler, M., Verma, S., Shrikhande, G., Byrne, C.H., Pride, Y.B., Winkler, T., Greenfield, E.A., Salgia, R., and Griffin, J.D. (2000). The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 24273-24278.
- Saurin, A.J., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kingston, R.E. (2001). A Drosophila Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature* 412, 655-660.
- Sauvageau, M., and Sauvageau, G. (2010). Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell* 7, 299-313.
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W.T., Clarkson, B., and Kuriyan, J. (2000). Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289, 1938-1942.
- Schmidt, T., Kharabi Masouleh, B., Loges, S., Cauwenberghs, S., Fraisl, P., Maes, C., Jonckx, B., De Keersmaecker, K., Kleppe, M., Tjwa, M., *et al.* (2011). Loss or inhibition of stromal-derived PIGF prolongs survival of mice with imatinib-resistant Bcr-Abl1(+) leukemia. *Cancer Cell* 19, 740-753.
- Schwartz, Y.B., Kahn, T.G., Nix, D.A., Li, X.Y., Bourgon, R., Biggin, M., and Pirrotta, V. (2006). Genome-wide analysis of Polycomb targets in Drosophila melanogaster. *Nat Genet* 38, 700-705.
- Sekulic, A., Haluska, P., Jr., Miller, A.J., Genebriera De Lamo, J., Ejadi, S., Pulido, J.S., Salomao, D.R., Thorland, E.C., Vile, R.G., Swanson, D.L., *et al.* (2008). Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc* 83, 825-846.
- Sengupta, A., Ficker, A.M., Dunn, S.K., Madhu, M., and Cancelas, J.A. (2012). Bmi1 reprograms CML B-lymphoid progenitors to become B-ALL-initiating cells. *Blood* 119, 494-502.
- Sewalt, R.G., Gunster, M.J., van der Vlag, J., Satijn, D.P., and Otte, A.P. (1999). C-Terminal binding protein is a transcriptional repressor that interacts with a specific class of vertebrate Polycomb proteins. *Molecular and cellular biology* 19, 777-787.
- Shah, N.P., Nicoll, J.M., Nagar, B., Gorre, M.E., Paquette, R.L., Kuriyan, J., and Sawyers, C.L. (2002). Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2, 117-125.
- Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J.R., Wu, C.T., Bender, W., and Kingston, R.E. (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* 98, 37-46.
- Sharov, A.A., and Ko, M.S. (2007). Human ES cell profiling broadens the reach of bivalent domains. *Cell Stem Cell* 1, 237-238.
- Shen, X., Liu, Y., Hsu, Y.J., Fujiwara, Y., Kim, J., Mao, X., Yuan, G.C., and Orkin, S.H. (2008). EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Molecular cell* 32, 491-502.
- Sheng, Z., Ma, L., Sun, J.E., Zhu, L.J., and Green, M.R. (2011). BCR-ABL suppresses autophagy through ATF5-mediated regulation of mTOR transcription. *Blood* 118, 2840-2848.
- Siddique, H.R., Parray, A., Tarapore, R.S., Wang, L., Mukhtar, H., Karnes, R.J., Deng, Y., Konety, B.R., and Saleem, M. (2013). BMI1 polycomb group protein acts as a master switch for growth and death of tumor cells: regulates TCF4-transcriptional factor-induced BCL2 signaling. *PLoS One* 8, e60664.
- Signorovitch, J., Ayyagari, R., Reichmann, W.M., Wu, E.Q., and Chen, L. (2014). Major molecular response during the first year of dasatinib, imatinib or nilotinib treatment for newly diagnosed chronic myeloid leukemia: a network meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 40, 285-292.
- Simon, J.A., and Kingston, R.E. (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 697-708.

- Sinclair, A., Latif, A.L., and Holyoake, T.L. (2013). Targeting survival pathways in chronic myeloid leukaemia stem cells. *Br J Pharmacol* 169, 1693-1707.
- Skorski, T., Kanakaraj, P., Nieborowska-Skorska, M., Ratajczak, M.Z., Wen, S.C., Zon, G., Gewirtz, A.M., Perussia, B., and Calabretta, B. (1995). Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 86, 726-736.
- Song, J.S., Swann, P.G., Szallasi, Z., Blank, U., Blumberg, P.M., and Rivera, J. (1998). Tyrosine phosphorylation-dependent and -independent associations of protein kinase C-delta with Src family kinases in the RBL-2H3 mast cell line: regulation of Src family kinase activity by protein kinase C-delta. *Oncogene* 16, 3357-3368.
- Song, L.B., Zeng, M.S., Liao, W.T., Zhang, L., Mo, H.Y., Liu, W.L., Shao, J.Y., Wu, Q.L., Li, M.Z., Xia, Y.F., *et al.* (2006). Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer research* 66, 6225-6232.
- Soverini, S., Hochhaus, A., Nicolini, F.E., Gruber, F., Lange, T., Saglio, G., Pane, F., Muller, M.C., Ernst, T., Rosti, G., *et al.* (2011). BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 118, 1208-1215.
- Spivakov, M., and Fisher, A.G. (2007). Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet* 8, 263-271.
- Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertrand, F.E., and McCubrey, J.A. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18, 189-218.
- Su, W.J., Fang, J.S., Cheng, F., Liu, C., Zhou, F., and Zhang, J. (2013). RNF2/Ring1b negatively regulates p53 expression in selective cancer cell types to promote tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1720-1725.
- Sun, G.G., Zhang, J., and Hu, W.N. (2014). CCNG2 expression is downregulated in colorectal carcinoma and its clinical significance. *Tumour Biol* 35, 3339-3346.
- Tetsu, O., Ishihara, H., Kanno, R., Kamiyasu, M., Inoue, H., Tokuhisa, T., Taniguchi, M., and Kanno, M. (1998). mel-18 negatively regulates cell cycle progression upon B cell antigen receptor stimulation through a cascade leading to c-myc/cdc25. *Immunity* 9, 439-448.
- Tonkin, E., Hagan, D.M., Li, W., and Strachan, T. (2002). Identification and characterisation of novel mammalian homologues of Drosophila polyhomeotic permits new insights into relationships between members of the polyhomeotic family. *Hum Genet* 111, 435-442.
- Trojer, P., Cao, A.R., Gao, Z., Li, Y., Zhang, J., Xu, X., Li, G., Losson, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., *et al.* (2011). L3MBTL2 protein acts in concert with PcG protein-mediated monoubiquitination of H2A to establish a repressive chromatin structure. *Molecular cell* 42, 438-450.
- Tuveson, D.A., Willis, N.A., Jacks, T., Griffin, J.D., Singer, S., Fletcher, C.D., Fletcher, J.A., and Demetri, G.D. (2001). STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene* 20, 5054-5058.
- Vakana, E., Altman, J.K., Glaser, H., Donato, N.J., and Platanias, L.C. (2011). Antileukemic effects of AMPK activators on BCR-ABL-expressing cells. *Blood* 118, 6399-6402.
- van der Lugt, N.M., Domen, J., Linders, K., van Roon, M., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van der Valk, M., Deschamps, J., Sofroniew, M., van Lohuizen, M., *et al.* (1994). Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes & development* 8, 757-769.
- van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijen, B., Wientjens, E., van der Gulden, H., and Berns, A. (1991). Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65, 737-752.

- Vandamme, J., Volkel, P., Rosnoblet, C., Le Faou, P., and Angrand, P.O. (2011). Interaction proteomics analysis of polycomb proteins defines distinct PRC1 complexes in mammalian cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10, M110 002642.
- Villa, R., Pasini, D., Gutierrez, A., Morey, L., Occhionorelli, M., Vire, E., Nomdedeu, J.F., Jenuwein, T., Pelicci, P.G., Minucci, S., *et al.* (2007). Role of the polycomb repressive complex 2 in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Cell* 11, 513-525.
- Voigt, P., Tee, W.W., and Reinberg, D. (2013). A double take on bivalent promoters. *Genes & development* 27, 1318-1338.
- Voncken, J.W., Niessen, H., Neufeld, B., Rennefahrt, U., Dahlmans, V., Kubben, N., Holzer, B., Ludwig, S., and Rapp, U.R. (2005). MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1. *The Journal of biological chemistry* 280, 5178-5187.
- Voncken, J.W., Roelen, B.A., Roefs, M., de Vries, S., Verhoeven, E., Marino, S., Deschamps, J., and van Lohuizen, M. (2003). Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2468-2473.
- Waldron, T., De Dominici, M., Soliera, A.R., Audia, A., Iacobucci, I., Lonetti, A., Martinelli, G., Zhang, Y., Martinez, R., Hyslop, T., *et al.* (2012). c-Myb and its target Bmi1 are required for p190BCR/ABL leukemogenesis in mouse and human cells. *Leukemia* 26, 644-653.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004a). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873-878.
- Wang, H.B., Liu, G.H., Zhang, H., Xing, S., Hu, L.J., Zhao, W.F., Xie, B., Li, M.Z., Zeng, B.H., Li, Y., *et al.* (2013). Sp1 and c-Myc regulate transcription of BMI1 in nasopharyngeal carcinoma. *Febs J* 280, 2929-2944.
- Wang, J.Y. (2014). The capable ABL: what is its biological function? *Molecular and cellular biology* 34, 1188-1197.
- Wang, L., Brown, J.L., Cao, R., Zhang, Y., Kassis, J.A., and Jones, R.S. (2004b). Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Molecular cell* 14, 637-646.
- Wang, R., Taylor, A.B., Leal, B.Z., Chadwell, L.V., Ilangoan, U., Robinson, A.K., Schirf, V., Hart, P.J., Lafer, E.M., Demeler, B., *et al.* (2010a). Polycomb group targeting through different binding partners of RING1B C-terminal domain. *Structure* 18, 966-975.
- Wang, Y., Guan, Y., Wang, F., Huang, A., Wang, S., and Zhang, Y.A. (2010b). Bmi-1 regulates self-renewal, proliferation and senescence of human fetal neural stem cells in vitro. *Neurosci Lett* 476, 74-78.
- Warr, M.R., Binnewies, M., Flach, J., Reynaud, D., Garg, T., Malhotra, R., Debnath, J., and Passegue, E. (2013). FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* 494, 323-327.
- Weisberg, E., Azab, A.K., Manley, P.W., Kung, A.L., Christie, A.L., Bronson, R., Ghobrial, I.M., and Griffin, J.D. (2012). Inhibition of CXCR4 in CML cells disrupts their interaction with the bone marrow microenvironment and sensitizes them to nilotinib. *Leukemia* 26, 985-990.
- Weisberg, E., Manley, P.W., Cowan-Jacob, S.W., Hochhaus, A., and Griffin, J.D. (2007). Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 7, 345-356.
- Weisberg, S.P., Smith-Raska, M.R., Esquilin, J.M., Zhang, J., Arenzana, T.L., Lau, C.M., Churchill, M., Pan, H., Klinakis, A., Dixon, J.E., *et al.* (2014). ZFX controls propagation and prevents differentiation of acute T-lymphoblastic and myeloid leukemia. *Cell Rep* 6, 528-540.
- Westbrook, C.A., Hooberman, A.L., Spino, C., Dodge, R.K., Larson, R.A., Davey, F., Wurster-Hill, D.H., Sobol, R.E., Schiffer, C., and Bloomfield, C.D. (1992). Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study (8762). *Blood* 80, 2983-2990.

- Whitcomb, S.J., Basu, A., Allis, C.D., and Bernstein, E. (2007). Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. *Trends Genet* 23, 494-502.
- Wilkinson, F.H., Park, K., and Atchison, M.L. (2006). Polycomb recruitment to DNA in vivo by the YY1 REPO domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19296-19301.
- Wong, S., and Witte, O.N. (2004). The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu Rev Immunol* 22, 247-306.
- Woo, C.J., Kharchenko, P.V., Daheron, L., Park, P.J., and Kingston, R.E. (2010). A region of the human HOXD cluster that confers polycomb-group responsiveness. *Cell* 140, 99-110.
- Wotton, D., and Merrill, J.C. (2007). Pc2 and SUMOylation. *Biochem Soc Trans* 35, 1401-1404.
- Wu, Z.L., Zheng, S.S., Li, Z.M., Qiao, Y.Y., Aau, M.Y., and Yu, Q. (2010). Polycomb protein EZH2 regulates E2F1-dependent apoptosis through epigenetically modulating Bim expression. *Cell Death Differ* 17, 801-810.
- Xenaki, D., Pierce, A., Underhill-Day, N., Whetton, A.D., and Owen-Lynch, P.J. (2004). Bcr-Abl-mediated molecular mechanism for apoptotic suppression in multipotent haemopoietic cells: a role for PKC β II. *Cell Signal* 16, 145-156.
- Xi, H., Yu, Y., Fu, Y., Foley, J., Halees, A., and Weng, Z. (2007). Analysis of overrepresented motifs in human core promoters reveals dual regulatory roles of YY1. *Genome research* 17, 798-806.
- Xie, X., Piao, L., Cavey, G.S., Old, M., Teknos, T.N., Mapp, A.K., and Pan, Q. (2014). Phosphorylation of Nanog is essential to regulate Bmi1 and promote tumorigenesis. *Oncogene* 33, 2040-2052.
- Xu, Y., Li, Y., Pang, Y., Ling, M., Shen, L., Yang, X., Zhang, J., Zhou, J., Wang, X., and Liu, Q. (2012). EMT and stem cell-like properties associated with HIF-2 α are involved in arsenite-induced transformation of human bronchial epithelial cells. *PLoS One* 7, e37765.
- Xue, Z.H., Zhao, C.Q., Chua, G.L., Tan, S.W., Tang, X.Y., Wong, S.C., and Tan, S.M. (2010). Integrin α M β 2 clustering triggers phosphorylation and activation of protein kinase C δ that regulates transcription factor Foxp1 expression in monocytes. *J Immunol* 184, 3697-3709.
- Yadav, A.K., Sahasrabudhe, A.A., Dimri, M., Bommi, P.V., Sainger, R., and Dimri, G.P. (2010). Deletion analysis of BMI1 oncoprotein identifies its negative regulatory domain. *Mol Cancer* 9, 158.
- Yamashita, M., Kuwahara, M., Suzuki, A., Hirahara, K., Shinnaksu, R., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S., Iwama, A., and Nakayama, T. (2008). Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the Noxa gene. *J Exp Med* 205, 1109-1120.
- Yang, J., Chai, L., Liu, F., Fink, L.M., Lin, P., Silberstein, L.E., Amin, H.M., Ward, D.C., and Ma, Y. (2007). Bmi-1 is a target gene for SALL4 in hematopoietic and leukemic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10494-10499.
- Yang, M.H., Hsu, D.S., Wang, H.W., Wang, H.J., Lan, H.Y., Yang, W.H., Huang, C.H., Kao, S.Y., Tzeng, C.H., Tai, S.K., *et al.* (2010). Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 12, 982-992.
- Yap, K.L., Li, S., Munoz-Cabello, A.M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M.J., and Zhou, M.M. (2010). Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Molecular cell* 38, 662-674.
- Yin, T., Wei, H., Leng, Z., Yang, Z., Gou, S., Wu, H., Zhao, G., Hu, X., and Wang, C. (2011). Bmi-1 promotes the chemoresistance, invasion and tumorigenesis of pancreatic cancer cells. *Chemotherapy* 57, 488-496.

Yip, K.W., Ito, E., Mao, X., Au, P.Y., Hedley, D.W., Mocanu, J.D., Bastianutto, C., Schimmer, A., and Liu, F.F. (2006). Potential use of alexidine dihydrochloride as an apoptosis-promoting anticancer agent. *Mol Cancer Ther* 5, 2234-2240.

Yu, M., Mazor, T., Huang, H., Huang, H.T., Kathrein, K.L., Woo, A.J., Chouinard, C.R., Labadorf, A., Akie, T.E., Moran, T.B., *et al.* (2012). Direct recruitment of polycomb repressive complex 1 to chromatin by core binding transcription factors. *Molecular cell* 45, 330-343.

Zalcborg, J.R., Friedlander, M.L., and Minden, M.D. (1986). Molecular evidence for the clonal origin of blast crisis in chronic myeloid leukaemia. *British journal of cancer* 53, 459-464.

Zhang, B., Li, M., McDonald, T., Holyoake, T.L., Moon, R.T., Campana, D., Shultz, L., and Bhatia, R. (2013). Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt-beta-catenin signaling. *Blood* 121, 1824-1838.

Zhang, B., and Zheng, Y. (1998). Regulation of RhoA GTP hydrolysis by the GTPase-activating proteins p190, p50RhoGAP, Bcr, and 3BP-1. *Biochemistry* 37, 5249-5257.

Zhao, C., Chen, A., Jamieson, C.H., Fereshteh, M., Abrahamsson, A., Blum, J., Kwon, H.Y., Kim, J., Chute, J.P., Rizzieri, D., *et al.* (2009). Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 458, 776-779.

Zhao, H., Tian, W., and Cohen, D.M. (2002a). Rottlerin inhibits tonic-dependent expression and action of TonEBP in a PKCdelta-independent fashion. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F710-717.

Zhao, X., Ghaffari, S., Lodish, H., Malashkevich, V.N., and Kim, P.S. (2002b). Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain. *Nature structural biology* 9, 117-120.

Zimmermann, M., Arachchige-Don, A.S., Donaldson, M.S., Dallapiazza, R.F., Cowan, C.E., and Horne, M.C. (2012). Elevated cyclin G2 expression intersects with DNA damage checkpoint signaling and is required for a potent G2/M checkpoint arrest response to doxorubicin. *The Journal of biological chemistry* 287, 22838-22853.