



HAL
open science

HIF-1 α , un acteur essentiel de la neurogenèse et de la migration radio-induite des cellules souches de gliomes

Mahasen Osman Saati

► **To cite this version:**

Mahasen Osman Saati. HIF-1 α , un acteur essentiel de la neurogenèse et de la migration radio-induite des cellules souches de gliomes. Neurobiologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCC337 . tel-03934761

HAL Id: tel-03934761

<https://theses.hal.science/tel-03934761>

Submitted on 11 Jan 2023

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.

Thèse de doctorat de
L'Université Sorbonne Paris Cité
Préparée à l'Université Paris Diderot
Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité - ED562
Laboratoire de RadioPathologie - CEA - Inserm U967

HIF-1 α , un acteur essentiel de la neurogenèse et de la migration radio-induite des cellules souches de gliomes

Par Mahasen Osman SAATI

Thèse de doctorat de Neurobiologie

Dirigée par Docteur Laurent GAUTHIER

Présentée et soutenue publiquement au CEA le 29 novembre 2018

Professeur Pierre VERRELLE	Université Clermont Auvergne / Institut Curie	Président du jury
Docteur Fabien MILLIAT	IRSN - Fontenay-aux-Roses	Rapporteur
Professeur Emmanuel MOYSE	Université de Tours	Rapporteur
Docteur Alexandra WINKELER	CEA - Orsay	Examineur
Docteur Laurent GAUTHIER	CEA - Fontenay-aux-Roses	Directeur de thèse

Dédicaces

« On no soul doth GOD place a burden greater than it can bear »

« Not once did GOD say worry about it or stress over it, HE said trust ME»

*A mes très chers parents, je vous dédie ce travail, le témoignage de mon profond amour
et de ma reconnaissance éternelle, je vous aime*

Titre : HIF-1 α , un acteur essentiel de la neurogenèse et de la migration radio-induite des cellules souches de gliomes

Résumé :

La régulation de la neurogenèse embryonnaire implique de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques délivrés avec une séquence temporelle stricte. Parmi ces facteurs, l'oxygène joue un rôle important dans la maintenance et la différenciation des cellules souches neurales (CSN). Dans ce contexte, le facteur de transcription HIF-1 α , un des principaux intervenants dans les réponses adaptatives aux variations d'oxygène, pourrait jouer un rôle majeur dans la neurogenèse embryonnaire notamment au niveau des CSN.

Dans ce but, nous avons évalué les conséquences de la perte de HIF-1 α sur la neurogenèse en développant un modèle de souris transgénique Glast-YFP-CreERT2;HIF-1 α ^{flox/flox} dans lequel HIF-1 α est spécifiquement inhibé dans les cellules de la glie radiaire GLAST⁺, cellules faisant office de CSN chez l'embryon. Dans ce modèle HIF-1 α CKO, une altération importante et rapide de l'angiogenèse corticale associée à une diminution de l'épaisseur du néocortex est observée. Ces changements ne sont pas corrélés à une mort cellulaire corticale mais sont associés à une diminution significative du nombre de mitoses et de la prolifération cellulaire au niveau des régions ventriculaire et sous-ventriculaire. Cette perte fonctionnelle de HIF-1 α provoque également une diminution du nombre des cellules Sox2⁺ et Pax6⁺ et une augmentation des progéniteurs intermédiaires (Tbr2⁺). Ces données suggèrent donc que HIF-1 α dans les CSN joue un rôle essentiel sur la neurogenèse embryonnaire.

Parallèlement, j'ai participé à l'identification d'acteurs moléculaires impliqués dans la migration/invasion radio-induite des cellules souches de gliomes (CSG) précédemment mise en évidence au laboratoire. Nos résultats démontrent que la migration radio-induite des CSG est dépendante de HIF-1 α qui intervient en régulant positivement la protéine JMY qui, de par son activité de polymérisation des filaments d'actine favorise la migration cellulaire. A l'instar des CSG, des expériences de vidéo-microscopie montrent que la migration radio-induite observée dans les CSN est également dépendante de HIF-1 α .

En conclusion, le développement d'un modèle transgénique knockout conditionnel inductible Glast-YFP-CreERT2; HIF-1 α ^{flox/flox} nous a permis de caractériser l'importance de HIF-1 α dans les CSN au cours de la neurogenèse. Son utilisation devrait également nous permettre d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires dépendants de HIF-1 α impliqués dans la migration radio-induite des CSN et des CSG. De par leurs caractéristiques communes avec les CSG, l'identification de ces nouveaux acteurs identifiés dans les CSN pourrait représenter de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer à plus long terme l'efficacité des traitements des patients atteints de glioblastomes par l'inhibition de mécanismes moléculaires stimulant la migration radio-induite des CSG au cours de la radiothérapie.

Mots Clefs : HIF-1 α – Neurogenèse embryonnaire – Mitose - Migration radio-induite – Cellules souches de gliomes – JMY – Radiation sublétales

Title : HIF-1 α , a key factor in the neurogenesis and radiation-induced migration of glioma stem cells

Abstract :

The regulation of embryonic neurogenesis involves many intrinsic and extrinsic factors delivered within a strict temporal sequence. Among these factors, oxygen plays an important role in the maintenance and the differentiation of neural stem cells (NSCs) located in hypoxic areas of the brain. In this context, the transcription factor HIF-1 α , one of the main contributors in adaptive responses to oxygen variations, could play a major role in embryonic neurogenesis.

We evaluated the consequences of the loss of HIF-1 α on neurogenesis by developing a model of transgenic mice Glast-YFP-CreERT2; HIF-1 α ^{flox/flox} in which HIF-1 α is specifically inhibited in the GLAST⁺ radial glia cells, which play the role of neural stem cells in the embryo. In this model, the loss of HIF-1 α caused a significant and rapid alteration of cortical angiogenesis associated with a decrease in the neocortex thickness. These changes were not correlated with cortical cell death but to a decrease in the number of mitoses and in cell proliferation in the ventricular and subventricular regions. HIF-1 α inactivation caused a loss of Sox2⁺ and Pax6⁺ cells and an increase in intermediate progenitors (Tbr2⁺). These data suggest that HIF-1 α plays an essential role in embryonic neurogenesis.

At the same time, I participated in the identification of molecular actors involved in the radiation-induced migration of glioma stem cells (GSCs) which was previously demonstrated in our laboratory. Our data show that the radiation-induced migration of the GSCs is HIF-1 α dependent and enhances JMY expression, a protein that has the ability to promote cell motility by enhancing the polymerization of actin filaments. Like the GSCs, *in vitro* video-microscopy experiments demonstrate that sublethal irradiation induced an HIF-1 α dependent migration in NSCs. These *in vitro* results were confirmed *in vivo* in our transgenic model.

In conclusion, the development of the transgenic inducible conditional knockout model Glast-YFP-CreERT2; HIF-1 α ^{flox/flox} allowed us to characterize the role of HIF-1 α in NSCs during embryonic neurogenesis. This model will allow us to identify new HIF-1 α dependent molecular actors involved in the radiation-induced migration of NSCs and GSCs. Due to their common characteristics with GSCs, the identification of the newly identified molecules in NSCs could represent new therapeutic targets destined to improve in the longer term the efficacy of glioblastomas patients treatment. The inhibition of these new molecular mechanisms during radiotherapy may be effective to prevent the radiation-induced migration of GSCs.

Keywords : HIF-1 α – Embryonic neurogenesis – Mitosis – Radiation induced migration – Glioma stem cells – JMY – Sublethal radiation

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je remercie le bon DIEU, tout puissant, de m'avoir donné l'audace et la force pour dépasser toutes les difficultés et bien finir mes études depuis le début de mon parcours de pharmacie jusqu'au jour de l'achèvement de ce travail de thèse.

Je remercie mon directeur de thèse, Dr. Laurent GAUTHIER, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral et pour les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. Je suis ravie d'avoir effectué la première thèse réalisée sous sa direction et d'avoir travaillé en sa compagnie. Il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

J'exprime mes profonds remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail, les rapporteurs Dr. Fabien MILLIAT et Prof. Emmanuel MOYSE ainsi que les examinateurs Dr. Alexandra WINKELER et Prof. Pierre VERRELLE. Merci d'avoir accordé du temps pour lire et évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à remercier aussi le directeur du laboratoire, Dr. François BOUSSIN de m'avoir accueillie au sein de son Laboratoire de RadioPathologie LRP.

Aux membres du laboratoire, je remercie Christine et Alexandra d'avoir participé à la relecture de l'introduction et donné des conseils pertinents. Je remercie Olivier pour son accueil généreux à chaque fois que j'ai sollicité son aide. Je remercie aussi Marc-André, Benjamin, Corentin, Thierry et Sofiane. Je vous souhaite tous plein de succès dans vos projets.

Mes remerciements vont également à Jan et Nathalie et Vilma, qui, sans leur générosité et leur bonne humeur je n'aurais jamais pu progresser dans ce travail. Je remercie également tout le personnel de l'animalerie et plus spécialement Maeva et Julien pour leur aide et leur soutien.

Je remercie énormément ma famille, qui, autant d'expressions aussi éloquentes soit-elles, ne sauraient exprimer ma gratitude envers chacun parmi eux. Ma chère Maman Fida "ma fifi", la plus bonne Maman à mes yeux, et Papa habibi Osman, le plus humain cardiologue du monde, votre présence et vos encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. Merci d'avoir créé notre famille, je vous dois ce que je suis aujourd'hui et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir. Je vous dédie ce travail en signe de mon profond estime. A Sara, ma soeur, ma belle pharmacienne et mon amie d'enfance, à Radwan, mon frère, notre cher future cardiologue, à Mireille et Lara, mes petites soeurs, habibeti, merci d'être toujours là pour moi. Votre amour m'a aidé à surmonter pleins d'épreuves, puisse le tout puissant vous donner tous santé, bonheur et longue vie. Merci de me donner tant d'amour et d'être simplement là. Je vous adore tous.

Un super grand merci à mon mari, Samer, le meilleur chef de projet-ingénieur à mes yeux! Merci d'exister pour moi, de m'avoir soutenue, de m'apporter force et courage, d'être prêt à toujours m'écouter et de ne me jamais laisser abandonner. Milles mercis habibi, mon meilleur ami. Merci aussi à

mes beaux-parents, tante Badrieh et aamo Nazih, ma belle-soeur Lara et mon beau-frère Dany, je suis fière et heureuse que vous faites une partie précieuse de ma vie.

Un grand merci à ma chère doudou, Dr. EL DOUAIHY, avec qui tout semble plus beau et facile. Merci pour tous les moments précieux qu'on a passé ensemble ces trois ans, merci d'être toujours à mes côtés. Nous avons partagé toute une vie qui restera à jamais dans mon cœur. Je remercie aussi ses chers parents, chers tante Mirna et aamo Michel qui me motivaient depuis toujours à achever ce travail de thèse.

Mes remerciements vont aussi à ma grande famille, très précieuse pour moi, ma grande-mère 'tayta Ikkal' et ma tante Zoukaa. A Sara, merci pour tes conseils pertinents chère Docteur! Je remercie aussi mes chères amies, Souha, Sara, Bayane, Imane et Rayane. Je vous souhaite une très belle vie pleine de succès et de satisfaction. Je vous aime tous.

Enfin, je remercie le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche qui a financé cette thèse et le Commissariat à l'énergie Atomique et aux énergies alternatives (CEA- Fontenay-aux-roses) qui m'a autorisé l'accès à son terrain et le travail au sein du laboratoire LRP.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES ABBREVIATIONS	13
AVANT-PROPOS.....	17
INTRODUCTION	19
I. Les facteurs induits par l'hypoxie (HIF-1)	21
1. Historique.....	21
2. Structure et expression des facteurs induits par l'hypoxie (HIFs)	22
2.1. HIF-1 α	23
2.2. HIF-1 β	24
2.3. HIF-2 α	25
2.4. HIF-3 α	25
3. Les voies de régulation de HIF-1 α	26
3.1. La régulation par la voie dépendante de l'oxygène	27
3.1.1. La voie pVHL- dépendante.....	28
3.1.2. Régulation de l'activité transcriptionnelle par l'hydroxylase FIH.....	29
3.1.3. Implication des ROS dans la régulation de HIF- 1 α	30
3.2. La régulation de HIF-1 α indépendante de l'oxygène	31
3.2.1. Les voies de signalisation des facteurs de croissance (PI 3-kinase et MAPK)	31
3.2.2. La voie Mdm2	32
3.2.3. La voie Hsp90	33
3.2.4. La voie p53	33
4. Gènes cibles et fonction de HIF-1 α en conditions physiologiques.....	34
4.1. Rôle dans l'érythropoïèse et le métabolisme ferrique.....	36
4.2. Rôle dans le métabolisme du glucose	36
4.3. Rôle dans l'angiogenèse	37
4.4. Rôle dans l'hématopoïèse et l'immunité.....	38
4.5. Rôle dans le développement neural.....	39
4.6. Rôle dans la prolifération et survie cellulaire.....	39
4.7. Rôle dans les phénomènes apoptotiques.....	39
4.8. Autres fonctions ciblées	40

5. HIF-1 α et cancer.....	40
5.1. HIF-1 dans les tissus tumoraux	40
5.2. Les aspects de la progression tumorale régulés par HIF-1 α	43
5.2.1 La transition épithéliale mésenchymateuse (TEM) et la métastase tumorale	44
5.2.2. L'angiogenèse tumorale.....	45
5.2.3. La survie et la prolifération cellulaire et l'apoptose	46
5.3. Les stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses impliquant HIF-1 α	47
II. Développement du cortex embryonnaire et neurogenèse	49
1. Le cortex cérébral.....	49
1.1. Origine du cortex cérébral.....	49
1.2. Structure du cortex cérébral	50
2. La neurogenèse.....	51
3. Les différents types de progéniteurs neuraux et les neurones post-mitotiques.....	53
3.1. Les progéniteurs apicaux	53
3.1.1. Les cellules neuroépithéliales	53
3.1.2. Les cellules de la glie radiaire apicale	54
3.2. Les progéniteurs basaux.....	55
3.2.1. Les progéniteurs intermédiaires	55
3.2.2. Les cellules de la glie radiaire basale	56
3.3. Les neurones post-mitotiques.....	58
4. Les marqueurs des progéniteurs neuronaux.....	59
4.1. La nestine.....	60
4.2. Sox2.....	61
4.3. Pax6.....	62
4.4. GLAST	64
4.5. La famille des gènes T-box	65
4.5.1. Tbr2	65
4.5.2 Tbr1	66
5. Les facteurs qui influencent le destin des progéniteurs neuraux.....	68
5.1. Le plan de clivage et l'héritage des processus apicaux et basaux	68
5.2. Le cycle cellulaire	70
5.3 Migration nucléaire intercinétique	72
5.4. Les voies de signalisation	73
5.5. L'effet des cellules endothéliales	76
6. Neurogenèse et HIF-1 α	76
6.1. L'effet de l'hypoxie sur les cellules souches neurales	76
6.2. Expression d'HIF-1 α	79

6.2.1. Au niveau du cerveau embryonnaire	79
6.2.2. Au niveau des cellules souches neurales	80
6.3. Rôle de HIF-1 α dans la neurogenèse	81
6.3.1. Au niveau des cellules souches neurales embryonnaires	81
6.3.2. Au niveau des cellules souches neurales adultes	84
III. La migration/invasion radio-induite dans le Glioblastome	87
1. Les gliomes et le glioblastome multiforme.....	87
1.1 Gliomes.....	87
1.2. Le glioblastome multiforme	88
1.2.1. Définition et aspect pathologique du glioblastome multiforme	88
1.2.2. Prise en charge thérapeutique du glioblastome multiforme (GBM)	89
1.2.3. Résistances des glioblastomes multiformes aux traitements.....	90
1.2.3.1. Chimiorésistance des GBM	90
1.2.3.2. Radiorésistance des GBM	91
1.2.3.3. Rôles des cellules souches de gliomes dans les récives des GBM	92
1.3. Les cellules souches de gliomes (CSG)	92
1.3.1. Caractéristiques des cellules souches de gliomes.....	92
1.3.2. Rôle des CSG dans la résistance à la radiothérapie.....	94
1.4. Hypoxie et HIF-1 α dans le glioblastome multiforme et les cellules souches de gliomes.....	96
1.4.1. Implication de HIF-1 α dans les CSG.....	99
2. La migration et l'invasion radio-induite.....	100
2.1. Mécanismes moléculaires impliqués dans la migration radio-induite des cellules cancéreuses	102
2.1.1. La transition épithéliale mésenchymateuse.....	106
2.1.2. La réorganisation du cytosquelette	107
2.1.3. L'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire.....	107
2.1.4. La protéolyse de la matrice extracellulaire	108
2.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans la migration/invasion dépendante d'HIF-1 α	109
2.2.1. La migration/invasion en condition d'hypoxie	109
2.2.2. La migration radio-induite	111
RESULTATS ET DISCUSSION	115
HIF-1α DANS LA NEUROGENESE EMBRYONNAIRE	115
I. Introduction.....	117
II. Matériels et méthodes.....	119
III. Résultats expérimentaux	125
1. Mise au point de l'induction sélective de la perte d'expression de HIF-1 α dans les GR au cours du développement embryonnaire.....	125

1.1. Démarche expérimentale	125
1.2. Optimisation des recombinaisons au cours du développement embryonnaire.....	125
1.3. Localisation des cellules YFP positives sauvages et floxées après traitement au tamoxifène	128
1.4. Validation de l'inhibition de HIF-1 α dans les CSN.....	129
2. L'épaisseur corticale est significativement diminuée dans les cerveaux d'embryons CKO.....	130
3. La déficience en HIF-1 α altère l'expression du VEGF, du GLUT1 en relation avec une altération de la vascularisation embryonnaire.....	131
4. Les cerveaux CKO HIF-1 α ne présentent pas d'apoptose spontanée détectable.....	132
5. La déficience de HIF-1 α induit une diminution du nombre de mitoses.....	133
6. La déficience de HIF-1 α diminue la prolifération des progéniteurs.....	135
7. La perte de HIF-1 α provoque une diminution des populations cellulaires Pax6 ⁺ et Sox2 ⁺	137
8. La perte de HIF-1 α provoque une accumulation des progéniteurs intermédiaires Tbr2 ⁺	137
9. Le nombre de neurones post-mitotiques Tbr1 ⁺ n'est pas modifié dans les animaux déficients pour HIF-1 α	138
10. Les altérations provoquées par la perte de HIF-1 α à un stade de développement plus précoce (E14.5) sont comparables à celles décrites à 16.5.....	141
IV. Discussion.....	147
1. Les conséquences de la délétion de HIF-1 α dans les cellules GLAST ⁺	148
1.1 Conséquences de la délétion de HIF-1 α sur la prolifération cellulaire.....	148
1.2. Conséquences de la délétion de HIF-1 α sur la division mitotique	150
1.3. Conséquences de la délétion de HIF-1 α sur la différenciation neuronale.....	152
1.4. Conséquences de la délétion de HIF-1 α sur l'épaisseur corticale, l'apoptose et l'angiogenèse.....	154
2. La réduction de l'angiogenèse induite par la délétion de HIF-1 α pourrait-elle avoir un impact sur la diminution du nombre de GR et de la taille du cortex ?	155
2.1. Relation entre l'angiogenèse et la régulation des CSN embryonnaires	155
2.2. Relation entre l'angiogenèse et la taille corticale	157
3. La diminution de la taille du cortex observée au niveau du télencéphale dorsal embryonnaire pourrait-elle être due à la diminution des interneurones GABAergiques provenant des éminences ganglionnaires ?.....	158
4. La voie Wnt/ β -caténine pourrait-elle réguler les progéniteurs ventriculaires Pax6 ⁺ et les progéniteurs intermédiaires Tbr2 ⁺ d'une manière HIF-1 α dépendante ?.....	160
RESULTATS ET DISCUSSION	163
HIF-1α DANS LA MIGRATION RADIO-INDUITE.....	163
I. Introduction.....	165
II. Publication.....	167
III. Résultats complémentaires.....	217
1. Impact d'une irradiation sublétales sur la migration/invasion des cellules souches neurales.....	217

1.1. Une irradiation de 0,5 Gy stimule la migration <i>in vitro</i> des CSN embryonnaires humaines et murines	217
1.2. L'irradiation augmente les capacités d'invasion des CSN greffées dans le cerveau	218
2. La migration radio-induite <i>in vitro</i> des CSN humaines embryonnaires est dépendante de HIF-1 α	219
3. Utilisation de CSN déficientes pour HIF-1 α pour valider son rôle dans la migration radio-induite des CSN murines embryonnaires.....	220
3.1. La migration radio-induite <i>in vitro</i> des CSN murines embryonnaires est dépendante de HIF-1 α ..	221
3.2. La migration radio-induite des CSN murines embryonnaires observée <i>in vivo</i> est dépendante de HIF-1 α	222
IV. Discussion.....	225
1. Rôle de la voie moléculaire HIF-1 α /JMY dans la migration en hypoxie ou après irradiation des CSG..	225
1.1. Implication de HIF-1 α dans la migration/invasion tumorale en hypoxie	225
1.2. HIF-1 α joue un rôle primordial dans la mise en place des mécanismes impliqués dans la migration/invasion radio-induite des CSG	226
1.3. Implication de JMY dans la migration radio-induite des CSG.....	228
1.4 L'induction des métallo-protéases par HIF-1 α pourrait-elle jouer un rôle dans la migration radio-induite des CSG ?.....	229
1.5 L'augmentation de JMY <i>via</i> HIF-1 α pourrait-elle exercée une influence sur d'autres protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire des CSG ?.....	230
2. HIF-2 α joue-t-il un rôle dans la migration radio-induite des CSG ?.....	230
3. Importance du caractère souche et non souche des cellules de GBM dans la migration/invasion radio-induite.....	231
3.1. La différenciation <i>in vivo</i> des CSG peut-elle prévenir la migration/invasion radio-induite des CSG ?	233
3.2. La dédifférenciation des cellules cancéreuses de GBM favoriserait-elle la migration radio-induite ?	234
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	237
BIBLIOGRAPHIE	243

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les domaines structuraux des membres de la famille HIF.	23
Figure 2: La régulation de HIF-1 α dépendante de l'oxygène.....	28
Figure 3: Les différentes voies de régulation de HIF-1 α	34
Figure 4: Exemples de gènes régulés par HIF-1 α et fonctionnant dans de nombreux aspects de la physiologie	35
Figure 5: Les gènes régulés par HIF-1 ayant un impact dans la tumorigenèse	44
Figure 6: Mécanisme d'action moléculaire des médicaments qui inhibent HIF-1.	48
Figure 7: Les différentes parties du système nerveux central : spécification régionale du cerveau en développement	50
Figure 8: Structure du cortex cérébral murin en développement.....	51
Figure 9: Neurogenèse embryonnaire chez la souris.....	52
Figure 10: Les divisions observées dans le cortex embryonnaire au cours du développement.	57
Figure 11: Origines distinctes des neurones excitateurs et des interneurons inhibiteurs dans le néocortex de souris en développement..	59
Figure 12: Lignées de cellules neuronales embryonnaires et profils d'expression de marqueurs.....	60
Figure 13: Hybridation <i>in situ</i> des ARNm codants pour la nestine à différents stades de développement embryonnaire chez la souris	61
Figure 14: Hybridation <i>in situ</i> des ARNm codants pour Sox2 à différents stades de développement embryonnaire chez la souris.....	62
Figure 15: Hybridation <i>in situ</i> des ARNm codants pour Pax6 à différents stades de développement embryonnaire chez la souris.....	63
Figure 16: Hybridation <i>in situ</i> des ARNm codants pour GLAST à différents stades de développement embryonnaire chez la souris.....	65
Figure 17: Hybridation <i>in situ</i> des ARNm codants pour Tbr2 à différents stades de développement embryonnaire chez la souris.....	66
Figure 18: Hybridation <i>in situ</i> des ARNm codants pour Tbr1 à différents stades de développement embryonnaire chez la souris.....	67
Figure 19: Illustrations de la division asymétrique versus division symétrique et des plans de clivage des cellules neuroépithéliales et des cellules de la glie radiaire.....	69
Figure 20: Représentation schématique des processus apicaux et basaux des cellules neuroépithéliales et des cellules de la glie radiaire.....	70
Figure 21: Polarité des cellules et migration intercinétique nucléaire.	73
Figure 22: Hybridation <i>in situ</i> des ARNm codants pour HIF-1 α à différents stades de développement embryonnaire chez la souris.....	79
Figure 23: Expression de HIF-1 α et sa co-localisation avec l'hypoxie sur coupe coronales de cerveau embryonnaire de souris à E13,5.....	80
Figure 24: Mise en évidence par immunofluorescence d'une association de HIF-1 α à des structures subcellulaires HBV (HIF-1 α bearing vesicles) dans cultures de cellules souches neurales embryonnaires.	81
Figure 25: Les caractéristiques anatomopathologiques du GBM.	88
Figure 26: Les principales voies de signalisation et de modification qui contribuent à la résistance thérapeutique des CSC	95
Figure 27: Représentation schématique de la croissance d'un GBM.	97
Figure 28: L'expression de HIF-1 α dans le GBM.....	98
Figure 29: Implication de HIF dans prolifération des CSG.	100
Figure 30: Les voies moléculaires impliquées dans la migration/invasion des métastases radio-induites	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Régulateurs de l'activité des HIFs.....	27
Tableau 2: Localisation cellulaire de la surexpression de HIF-1 α dans des cancers humains déterminée par IHC à partir de Biopsies tumorales des patients	42
Tableau 3: Association de la surexpression de HIF-1 α estimée par une analyse immunohistochimique sur des biopsies de différents types de tumeur avec la survie des patients	43
Tableau 4: Effet de l'irradiation sur la migration et l'invasion cellulaire de lignées tumorales des différentes origines tissulaires et les mécanismes détectés dans ces processus	104
Tableau 5: Effet de l'irradiation sur la migration et l'invasion cellulaire de lignées tumorales de glioblastome humain ou de rongeur (*) et les mécanismes détectés dans ces processus.	106

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABC	ATP Binding Cassette
ADM	Adrénomedulline
AEP	Zone Entopédonculaire Antérieure
AEP	Zone Entopédonculaire Antérieure
AFP-464	Amino flavone
AhR	Récepteur d'hydrocarbure d'aryle
Akt	Protein Kinase B
ANGPT1	Angiopoeitin
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor
ARD1	Arrest Defective-1
ARNT	Aryl Hydrocarbon Nuclear Receptor Translocator
Asn	Asparagine
ATM	Ataxia-Telangiectasia-Mutated
ATR	ATM and Rad-3-related
BAK	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl- associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BER	Base Excision Repair
bHLH	Motif basique hélice-boucle-hélice
BLPB	Brain Lipid Binding Protein
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BNIP3	Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3
CamKII	Calmodulin-Dependent protein Kinase II
ChK	Checkpoint kinase
CPNPC	Cancer du Poumon Non à Petites Cellules
CSC	Cellules Souches Cancéreuses
CSG	Cellules Souches de Gliomes
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSN	Cellules Souches Neurales
CTAD	Domaine de transactivation C-terminal
Ctip2	Chicken ovalbumin upstream promoter Transcription factor-Interacting Protein 2
DCX	Doublecortin
EAAT1	Excitatory Amino Acid Transporter
EDN1	Endothéline
EGF	Epidermal Growth Factor
EGL	Eminence Ganglionnaire Latérale
EGM	Eminence Ganglionnaire Médiale
EN1	Engrailed1
EPO	Erythropoïétine
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ERO	Elément de Réponse à l'hypoxie
ESC	Embryonic Stem Cell
ET1	Endotheline 1
Etv2	ETS translocation variant 2
FAK	Focal Adhesion kinase

Fas	Fatty acid synthase
FGF4	Fibroblast Growth Factor 4
FIH1	Factor Inhibiting HIF
GBM	Glioblastome Multiforme
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GGTI	GéranylGéranyl Transférase I
GLAST	Glutamate Aspartate Transporter
GLUT	Glucose Transporter
GR	Glue Radiaire
GRa	Glue Radiaire apicale
GRb	Glue Radiaire basale
H	Hippocampe
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HBV	HIF-1 α bearing vesicles
HDAC	Histone Déacétylase
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HMG	High Mobility Group
HRE	Hypoxia Responsive Element
HSP90	Heat Shock Protein
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF2	Insulin Like Growth Factor-2
IGFBP	(IGF)-binding proteins
ILK	Integrin Linked Kinases
IPAS	Inibitory Domain PAS protein
Klf4	Kruppel-like factor 4
Km	Constant Michaelis
L1CAM	L1 Cell Adhesion Molecule
LDHA	Lactate Déhydrogénase
Leu	Leucine
LGN	Leu-Gly-Asn repeat-enriched <i>protein</i>
Lox	Lysyl-oxidase
LW6	(aryloxyacetylamino)benzoic acid derivative
LZIP	Domaine Glissière à Leucine
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
Mdm2	Mouse Double Minute 2 homologue
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEK	(Mitogen-Activated Protein) Kinase
mESC	Cellules Souches Embryonnaires de souris
MGMT	MethylGuanine-MethylTransférase
MMP	Matrice Métallo-protéases
MMR	Mismatch repair
MSC	Se-méthylsélénocystéine
MZ	Mantle Zone
nCPI	Cellules des Progéniteurs Intermédiaires neurogéniques
Ncx	Néocortex
NE	Cellules Neuroépithéliales
NEPAS	PAS néonatale et embryonnaire
NF-κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NHEJ	Non Homologous End Joining
NLS	Signal de Localisation Nucléaire
NMDA	N-methyl-D-aspartate receptor
NO	Oxyde nitrique
NOS2	Oxyde Nitrique Synthétase
Noxa	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (Latin for damage)
NTAD	Domaine de transactivation N-terminal
Oct-4	Octamer-binding transcription factor 4
ODD	Domaine de dégradation dépendant de l'Oxygène
OMS	Organisation Mondiale de Santé
oSVZ	outer Subventricular Zone
P-gp	GlycoProtéine P
PAC	Domaine C-terminal associé à PAS
PAI	Inhibiteurs de l'Activateur du Plasminogène
PARP1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PAS	Per-ARNT-Sim
Pax6	Paired box 6 protein
PC	Plaque Corticale
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDK1	Pyruvate Déshydrogénase Kinase
Perp	p53 apoptosis effector related to PMP-22
PHD 1/2/3	Prolyl Hydroxylase Domain containing
PI	Progéniteurs Intermédiaires
PI3K	Phosphatidyl Inositol-4,5-biphosphate-3-Kinase
PINCH1	Cysteine-Histidine-rich 1 Protein
PL	Pallium Latéral
POA	Zone pré-optique
PP	Pré-Plaque
Pro	Proline
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Puma	p53 up-regulated modulator of apoptosis
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RACK1	Receptor of Activated Protein Kinase C
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma protein
Ras	Rat sarcoma protein (Proto-ONCOGENE PROTEIN P21)
rHRE	reverse HRE
ROS	Reactive Oxygen Species
Ser	Serine
SG	Survie Globale Médiane
SLC1A3	Solute Carrier Family 1 Member 3
SNC	Système Nerveux Central
SO	Superoxyde
SOD	Superoxydes Dismutases
Sox2	Sex determining region Y-box
SP	Subplate
TAD	Transactivation
Tbr1/Tbr2	T-box genes
TCF3	Transcription Factor 3

TEM	Transition Epithéliale Mésoenchymateuse
Tf	Transferrines
TGF-α	Transforming Growth Factor- α
Thr	Threonine
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TMZ	Témolozomide
Tyr	Tyrosine
uPAR	Plasminogène de type Urokinase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von Hippel-Lindau
Wnt	Wingless type MMTV integration site family member 1
YC-1	3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole
ZEB1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
ZI	Zone Intermédiaire
ZM	Zone Marginale
ZSV	Zone Sous-Ventriculaire
ZV	Zone Ventriculaire

AVANT-PROPOS

L'homéostasie de l'oxygène est une exigence indispensable des organismes cellulaires. Tous les organismes cellulaires possèdent des mécanismes pour maintenir cette homéostasie qui est essentielle à la survie (Semenza, 1999). HIF-1 α , le marqueur universel de l'hypoxie, a été identifié par sa régulation de transcription du gène de l'érythropoïétine humaine en hypoxie. La découverte de ce facteur de transcription a suscité depuis un grand intérêt en raison de son rôle critique retrouvé dans une multitude de processus développementaux, physiologiques et physiopathologiques (Semenza, 2003 ; Wang et Semenza, 1996).

Dans le but de mieux comprendre le rôle de HIF-1 α dans le développement du système nerveux central, nous avons évalué les conséquences de sa déficience au cours de la neurogenèse en développant un modèle de souris transgénique *Glast-YFP-CreERT2 ; HIF-1 α ^{flox/flox}* (HIF-1 α CKO) dans lequel HIF-1 α est spécifiquement inhibé de manière inductible en présence de tamoxifène dans les cellules de la glie radiaire exprimant *GLAST* qui font office de cellules souches neurales (CSN). Nos résultats qui reposent sur l'analyse des altérations morphologiques, de l'angiogenèse, de la prolifération cellulaire, de la division mitotique et des sous-types des progéniteurs neuraux retrouvés dans les différentes zones corticales mettent en évidence que la perte de HIF-1 α au niveau des CSN entraîne une altération rapide des sous-populations cellulaires retrouvées au niveau des différentes couches cellulaires du néocortex, suggérant que HIF-1 α joue un rôle important dans la neurogenèse embryonnaire.

Au niveau physiopathologique, HIF-1 α a été largement démontrée comme étant surexprimé dans différents types de tumeurs, conséquence entre autre, de l'état hypoxique retrouvée fréquemment au niveau des tumeurs solides (Semenza, 2001). Son accumulation est associée à un pronostic défavorable ainsi qu'à une faible chance de survie (Bertout et coll., 2008 ; Keith et coll., 2011 ; Semenza, 2011), plus particulièrement dans les glioblastomes (Yang et coll., 2012). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que HIF-1 α est impliqué dans les rechutes thérapeutiques, déclenchées notamment par des mécanismes de radiorésistances des cellules souches de glioblastome. La migration radio-induite des cellules de gliomes pourrait être associée à ces mécanismes de radiorésistance (Fujiwara et coll., 2007 ; Zhang et coll., 2013 ; Zhou et coll., 2013). Dans ce contexte, des expériences menées avant mon arrivée au laboratoire avaient mis en évidence qu'une irradiation sublétales de 0.5 Gy provoquait une

augmentation de la migration et de l'invasion des cellules souches de gliomes (CSG) aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* lors de greffes intracérébrales. Dans le but de limiter cette migration radio-induite pouvant contribuer aux rechutes fréquemment observées chez les patients atteints de glioblastome, j'ai participé à la mise en évidence d'une nouvelle voie dépendante de HIF-1 α . La caractérisation de cette voie et la recherche d'inhibiteurs spécifiques de cette voie pourrait contribuer à plus long terme à améliorer à l'efficacité des traitements du gliome. Ces résultats sont actuellement soumis pour publication.

Ce manuscrit débute par une introduction bibliographique traitant du facteur de transcription HIF-1 α , élément central de mon travail de thèse. J'ai ensuite développé un deuxième chapitre portant sur la neurogenèse embryonnaire, les cellules impliquées dans cette neurogenèse et les facteurs influençant le destin des progéniteurs neuraux. Ce deuxième chapitre se termine par des données de la littérature concernant le rôle de HIF-1 α au cours de la neurogenèse et plus spécifiquement au niveau des cellules souches neurales. Enfin, une troisième et dernière partie s'intéresse aux mécanismes impliqués dans la migration radio-induite des cellules souches de glioblastome. A la suite à cette introduction, je présente mes résultats concernant l'implication de HIF-1 α dans les cellules souches neurales au cours de la neurogenèse embryonnaire et des résultats sous forme d'un article s'intéressant au rôle de HIF-1 α dans la migration radio-induite des cellules souches de glioblastome. Pour chacune de ces recherches, des discussions distinctes sont engagées et suivies d'une conclusion générale qui conclue ce travail de thèse.

INTRODUCTION

I. Les facteurs induits par l'hypoxie (HIF-1)

Le développement complexe du système respiratoire et circulatoire constitue un moyen pour l'organisme d'assurer un apport optimal d'oxygène à l'ensemble des organes ainsi qu'aux cellules les constituants. Cependant, les nombreuses variations du niveau d'oxygène en conditions physiologiques ou en réponse à des pathologies nécessitent des réponses cellulaires adaptées pour éviter des dommages cellulaires qui pourraient être létaux. On retrouve parmi les acteurs responsables de l'adaptation cellulaire à l'oxygène, les facteurs regroupés au sein de la famille HIF qui joue un rôle important dans les mécanismes impliqués dans la réponse à l'hypoxie.

1. Historique

Au cours des dernières décennies, de multiples travaux ont étudié les réponses physiologiques, cellulaires et les voies moléculaires mises en place lors des variations d'oxygène pouvant se produire en conditions physiologiques ou pathologiques. Le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1) est un régulateur clé de la réponse cellulaire responsable de l'induction de gènes facilitant l'adaptation et la survie des cellules et de l'organisme entier de la normoxie (21% d'O₂) à l'hypoxie (1% O₂) (Wang 1995, Semenza 1998).

C'est en 1991 que Semenza et coll ont identifié pour la première fois l'implication de séquences spécifiques d'ADN dans le promoteur du gène de l'érythropoïétine (EPO), une hormone qui permet de stimuler la prolifération des érythrocytes en condition hypoxique (Semenza et coll., 1991). Cette étude montre qu'en réponse à l'hypoxie, l'induction d'un facteur nucléaire était capable de réguler l'activité transcriptionnelle du gène EPO *via* sa liaison à des séquences ADN agissant en Cis (5'-RCGTG-3') dénommées éléments de réponse à l'hypoxie (ERO) (ou Hypoxia Responsive Element : HRE) situées dans la région adjacente 3' du gène EPO. La présence de ces séquences a été démontrée comme étant essentielle pour l'activation transcriptionnelle du gène de l'EPO en réponse à l'hypoxie. A la suite de cette découverte, de multiples autres études ont pu démontrer dans des conditions d'hypoxie que l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes régulateurs était initiée par la liaison spécifique du facteur de transcription HIF-1 aux séquences HRE (Semenza, 1998, Semenza, 1999, Ke et Costa, 2006). C'est respectivement en 1993 et 1995 que Wang et Semenza ont pu déterminer par purification biochimique à partir de cellules hépatiques Hep3B cultivées en hypoxie et de cellules HeLa traitées par

le chlorure de cobalt que HIF-1 était composé des sous-unité HIF-1 α (120 kDa) et HIF-1 β (91-94 kDa) (Wang et coll, 1993 ; Wang et Semenza, 1995). Depuis, deux autres isoformes étroitement apparentés à HIF-1 α et à la même famille HIF ont été décrits : HIF-2 α et HIF-3 α (Ema et coll., 1997 ; Li et coll., 1996). Les isoformes HIF-1 α et HIF-2 α sont structurellement proches et sont les mieux caractérisées contrairement à l'isoforme HIF-3 α qui subit une régulation complexe et produit un grand nombre de variants d'épissage d'ARNm (Ravenna et coll., 2016).

2. Structure et expression des facteurs induits par l'hypoxie (HIFs)

L'hétérodimère HIF-1 est composé d'une sous-unité régulatrice α (HIF-1, HIF-2 ou HIF-3) dont l'expression est régulée par l'oxygène, et d'une sous-unité β appelée HIF-1 β ou ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Receptor Translocator) régulée d'une manière constitutive (Wang et coll., 1995, Figure 1). Ces protéines appartiennent à la famille des facteurs de transcription à motif basique hélice-boucle-hélice (bHLH)-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS). Ils partagent la région bHLH conservée pour la liaison à l'ADN, et deux domaines PAS pour la spécificité du gène cible et la dimérisation des sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β (Kimbrow et Simons, 2006). Le domaine PAS (Per-ARNT-Sim) est un homologue des deux protéines PER et SIM précédemment identifiées chez la drosophile (Nambu et coll., 1991). Les protéines bHLH sont caractérisées par des domaines (b, HLH, PAS et TAD) qui peuvent réguler leurs propres transcriptions ainsi que l'expression d'autres membres de la famille. Les motifs bHLH-PAS sont essentiels pour permettre la formation d'hétérodimères entre les sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β et pour la liaison à la séquence ADN HRE des gènes cibles. Les domaines de base b se sont avérés avoir des propriétés de liaison à l'ADN pour la liaison de l'HRE sur le gène, alors que le motif HLH est nécessaire à la dimérisation avec d'autres protéines. Il est intéressant de noter que le domaine PAS est le seul domaine conservé parmi tous les membres de cette famille de protéines (HIF-1 α , ARNT, AhR et PAS) et qu'il ne se trouve pas dans les autres types de protéines (Masoud et Li, 2015).

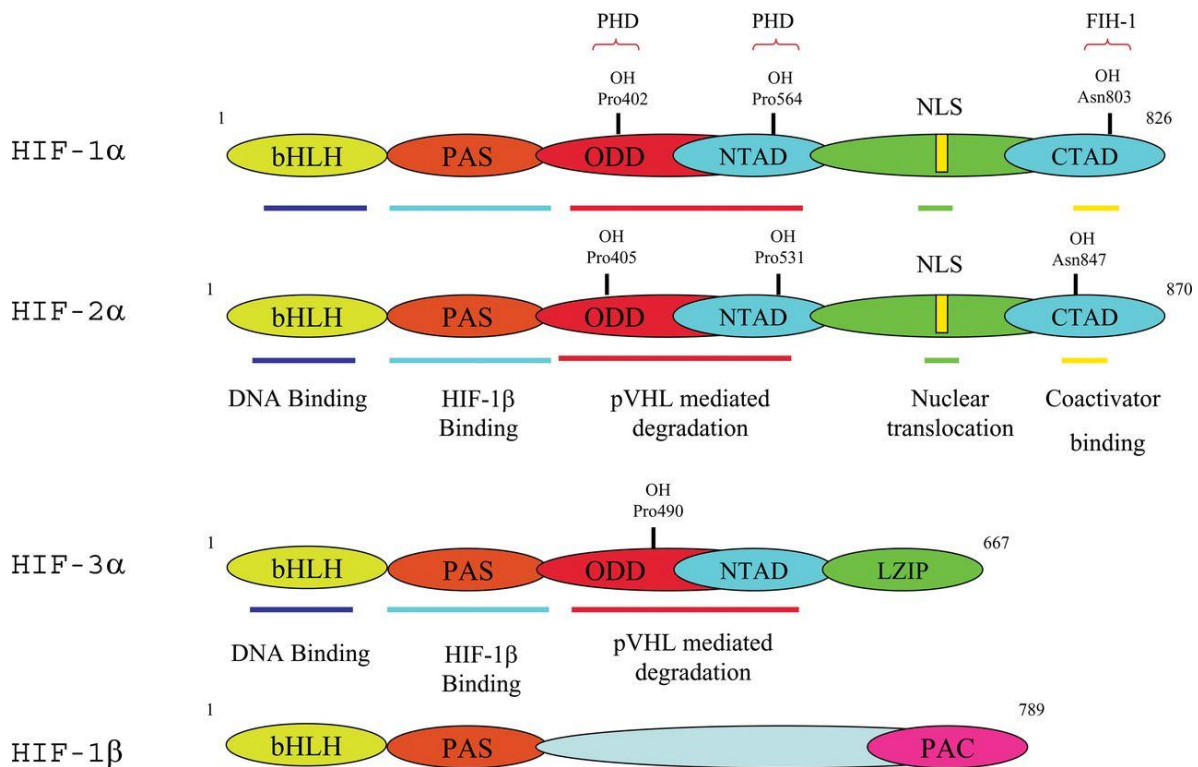


Figure 1: Les domaines structuraux des membres de la famille HIF. HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α et HIF-1 β . Les modifications des résidus spécifiques sont mises en évidence au-dessus de chaque protéine, et les protéines qui effectuent ces modifications sont montrées. Les barres colorées au-dessous de chaque protéine délimitent des régions d'interaction particulières au sein des protéines HIF. BHLH, hélice-boucle-hélice, PAS, Per / ARNT / Sim domaine, ODD, Domaine de dégradation dépendant de l'Oxygène, NTAD, Domaine de transactivation N-terminal, NLS, Signal de Localisation Nucléaire, CTAD, Domaine de Transactivation C-terminal, LZIP, Domaine glissière à Leucine, PAC, Domaine C-terminal associé à PAS (Kenneth et Rocha, 2008).

2.1. HIF-1 α

Le gène *Hif-1 α* est localisé dans la région 14q21-q24 et est composé de 15 exons. Il code pour la sous-unité HIF-1 α comprenant 826 acides aminés. HIF-1 α fait partie de la famille des bHLH-PAS (basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim) puisqu'elle possède dans sa partie amino-terminale un domaine bHLH de 13 acides aminés qui permet à la fois la dimérisation et la fixation à l'ADN (Crews 1998, Hoffman et coll., 1991 ; Wang et coll., 1995). Le domaine PAS situé à la suite du domaine bHLH est impliqué dans les interactions avec d'autres protéines. HIF-1 α possède également deux domaines de transactivation (TAD) : un en position amino-terminale (N-TAD, position 531-575) et le second en C-terminale (C-TAD, position 813-826) qui entoure un domaine inhibiteur de la transcription comprenant un signal de localisation nucléaire (NLS) (Pugh et coll., 1997, Jiang et coll., 1997, Ruas et coll., 2002). Ces deux domaines TAD sont responsables de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α (Li et coll., 1996). Ainsi, le domaine C-TAD (résidus 786-826) qui contient un site d'hydroxylation en position 803 au

niveau d'un résidu asparagine (Asn) interagit avec des co-activateurs tels que CBP / p300 pour moduler la transcription génique de HIF-1 α en conditions d'hypoxie alors que le domaine N-TAD est nécessaire à la stabilisation de HIF-1 α (Yamashita et coll., 2001). Le domaine ODD (Oxygen Degradation Domain, résidus 390-575) situé entre le domaine PAS et le domaine N-TAD, (Huang et coll., 1998) joue un rôle important dans la stabilité de la protéine par la présence de deux sites d'hydroxylation sur des résidus de proline en positions 402 et 564 (Bruick et McKnight, 2001, Semenza, 2017).

Il est également important de noter la présence de deux séquences NLS (Nuclear Localisation Sequences). La première est localisée dans le domaine bHLH. Sa répression par le domaine PAS permet la rétention de la protéine HIF-1 α dans le cytoplasme. La seconde située en position 718 à 721 (RKRK) jouerait un rôle important dans la translocation de la protéine HIF-1 α dans le noyau, en conditions d'hypoxie (Kallio et coll., 1998).

2.2. HIF-1 β

Le gène *Hif-1 β* est localisé en 1q21 et possède 22 exons. HIF-1 β est également connu sous le nom d'ARNT ou ARNT1 (Aryl Hydrocarbon Nuclear Receptor Translocator) car identifié initialement comme partenaire hétérodimérique du récepteur d'hydrocarbure d'aryle (AhR) (Hoffman et coll., 1991, Wang et coll., 1995). Appartenant à la famille bHLH-PAS, HIF-1 β qui possède 789 acides aminés est caractérisée par la présence d'un domaine PAS de 300 acides aminés immédiatement situé en position carboxy-terminal du domaine bHLH permettant les interactions avec les facteurs HIF et les séquences HRE au niveau de l'ADN (Hoffman et coll., 1991 ; Wang et coll., 1995). En revanche, et contrairement aux autres membres de la famille HIF, HIF-1 β ne possède pas de domaine ODD. Par conséquent, elle est exprimée de manière constitutive et n'est pas régulée par l'oxygène. HIF-1 β représente la sous-unité partenaire de tous les membres de la famille bHLH-PAS.

A noter qu'il existe une autre sous-unité β (ou ARNT2) qui possède 57% d'homologie avec ARNT1 et retrouvée uniquement dans le cerveau et le rein chez l'adulte (Maltepe et coll., 2000).

2.3. HIF-2 α

Le gène *Hif-2 α* est localisé en région 2p21-p16 et est constitué de 16 exons. Il code pour une sous-unité de 870 acides aminés. HIF-2 α encore connue sous le nom de EPAS1 car identifiée comme facteur de transcription dans des cellules endothéliales (Tian et coll., 1997) montre un degré notable de similarité de séquence d'acides aminés avec HIF-1 α (48% d'homologie). Ainsi, la présence des domaines bHLH, PAS, ODDD, ainsi que les deux domaines NTAD et CTAD qui entourent un domaine NLS sont communs à la protéine HIF-1. De même, deux sites d'hydroxylation sur les prolines 405 et 531 sont localisés au niveau du domaine ODD. On notera la présence d'un site d'hydroxylation sur l'asparagine 847 dans le domaine T-TAD. Malgré leur grande similarité de séquences, HIF-1 α et HIF-2 α présentent une distribution tissulaire différente. Alors que HIF-1 α est associée à une expression quasi ubiquitaire, HIF-2 α est surtout exprimée dans les cellules endothéliales au cours du développement embryonnaire. Dans les tissus adultes, son expression est majoritairement retrouvée dans certains types cellulaires comme les cellules endothéliales, les pneumocytes de type II, les cardiomyocytes, les fibroblastes rénaux, les cellules interstitielles du pancréas et du duodénum ainsi que dans les hépatocytes (Tian et coll., 1997 ; Ema et coll., 1997 ; Rankin et coll., 2008).

2.4. HIF-3 α

Le gène *Hif-3 α* est situé dans la région 19q13.32 et est composé de 19 exons. HIF-3 α a été initialement identifiée comme membre de la famille des protéines bHLH-PAS chez la souris (Gu et coll., 1998). La présence d'ARN messagers de HIF-3 α a été décrite dans de nombreux tissus comme le thymus, les poumons, le cœur, les reins, le foie, les yeux et le cerveau (Gu et coll., 1998). Le locus HIF-3 α donne lieu à de nombreux variants d'épissage dont les isoformes protéiques, HIF-3 α , NEPAS (PAS néonatale et embryonnaire) et IPAS (inibitory domain PAS protein) (Makino et coll., 2002 ; Maynard et coll., 2003 ; Yamashita et coll., 2008). Bien que la fonction de chaque variant dans la régulation complexe des gènes inductibles par l'hypoxie reste discutée (Ravenna et coll., 2016), le variant IPAS est capable de former un hétérodimère avec HIF-1 α contrecarrant ainsi l'action transcriptionnel du complexe HIF-1 α /HIF-1 β (Ravenna et coll., 2016). Au niveau structurel, HIF-3 α représente une forte homologie avec HIF-1 α et HIF-2 α au niveau de l'extrémité N-terminale et un faible degré de similarité de séquence à l'extrémité carboxy-terminale (Gu et coll., 1998). Les caractéristiques structurelles uniques de HIF-3 α par rapport à HIF-1 α et HIF-2 α comprennent la

présence d'une unique proline hydroxylable dans le domaine ODD en position 490 et d'un domaine glissière à leucine (LZIP) en position carboxy-terminale impliqué dans les interactions protéine-protéine. Alors qu'au stade embryonnaire et néonatal, les ARNm de HIF-3 α sont rarement détectés (Yamashita et coll., 2008), l'induction de l'expression de la protéine en conditions d'hypoxie est retrouvée dans plusieurs organes comme le cortex cérébral, l'hippocampe, le poumon, le cœur et le rein (Heidbreder et coll., 2003 ; Li et coll., 2006 ; Yoshida et coll., 2001). De la même façon que les protéines HIF-1 α et HIF-2 α , HIF-3 α est capable de se dimériser avec la sous-unité HIF- β , pour reconnaître le HRE sur le promoteur de gènes cibles (Gu et coll., 1998). Il est à noter que les complexes HIF-3 α /HIF-1 β (HIF3) ou NEPAS/HIF-1 β suppriment l'activation du gène induite par l'hypoxie ainsi que l'expression de HIF1 (HIF-1 α / HIF-1 β) ou HIF-2 (HIF-2 α / HIF-1 β) (Hara et coll., 2001 ; Yamashita et coll., 2008). Enfin, il a été montré que la liaison du complexe HIF-3 aux sites HRE dans les régions promotrices, induit une activité transcriptionnelle beaucoup plus faible que celle des complexes HIF-1 et HIF-2 du fait de l'absence du domaine C-TAD (Gu et coll., 1998 ; Hara et coll., 2001 ; Yamashita et coll., 2008).

3. Les voies de régulation de HIF-1 α

Le gène *Hif-1 α* et la protéine HIF-1 α étant continuellement transcrits, traduits et synthétisés, la stabilité et l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α sont régulées en amont par de nombreux facteurs de croissance et de voies de signalisation en fonction ou non du niveau d'oxygène (Bruick et coll., 2001). Toutefois dès 1998, il a été établi que les sous-unités HIF- α pouvaient être régulées par le niveau d'oxygène indépendamment des mécanismes précédemment décrits (Huang et coll., 1998). En conditions de normoxie la demi-vie de HIF-1 α a été estimée de l'ordre de 5 minutes suggérant qu'à expression constante, la régulation de HIF-1 α repose principalement sur sa vitesse de dégradation (Salceda et Caro, 1997). En conditions d'hypoxie, plusieurs voies ont été décrites depuis pour contrôler sa stabilité et son activité transcriptionnelle. On distingue d'une part, des voies de régulation dépendantes du niveau d'oxygène impliquant ou non des modifications post-traductionnelles reposant sur des réactions d'hydroxylation, d'acétylation, d'ubiquitination et de phosphorylation et d'autre part, des voies de régulation indépendantes du niveau d'oxygène mettant en jeu divers acteurs et voies de signalisation. Une liste non exhaustive de ces régulateurs est présentée dans le tableau 1.

Une fois stabilisée, HIF-1 α est transloquée dans le noyau. Cette étape est dépendante de la région NLS située en position carboxy-terminale de HIF-1 α . Dans le noyau, HIF-1 α a alors la capacité de se dimériser avec HIF-1 β (Eguchi et coll., 1997 ; Pollenz et coll., 1994). Cet hétérodimère se fixe alors sur les éléments HRE des gènes sensibles à l'hypoxie et induit la transactivation de ces derniers.

Régulateurs des HIFs	Effets sur l'activité des HIFs
VHL	↓ stabilité de HIF- α
HSP90	↑ stabilité de HIF- α
PHD 1/2/3	↓ stabilité de HIF- α
FIH1	↓ activité transcriptionnelle de HIF-1 α
2-Oxoglutarate	↓ stabilité de HIF-1 α comme un co-facteur de PHD
Ascorbate	↓ stabilité de HIF- α comme un co-facteur de PHD
Fer (Fe ²⁺)	↓ stabilité de HIF- α comme un co-facteur de PHD
Hypoxie intermittente	↑ stabilité de HIF-1 α mais ↓ stabilité de HIF-2 α
ROS	↑ stabilité de HIF- α
PI3K/Akt	↑ expression de HIF-1 α
mTORC1	↑ traduction des mRNA de HIF-1 α
p53	↓ expression de HIF-1 α /ARNT
Ras	↑ activité transcriptionnelle de HIF-1 α
NF- κ B	↑ transcription de HIF-1 α
p44/42 MAPK	↑ expression de HIF-1 α

Tableau 1: Régulateurs de l'activité des HIFs (Adapté de Majmundar et coll., 2010)

3.1. La régulation par la voie dépendante de l'oxygène

Trois grandes voies de régulation de HIF-1 α dépendantes du niveau d'oxygène ont été décrites. La première voie implique une interaction entre HIF-1 α et la protéine pVHL dépendante de modifications post-traductionnelles (hydroxylation, acétylation, ubiquitination). La seconde voie se situe au niveau des modifications post-traductionnelles d'HIF-1 α qui vont réguler l'efficacité de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α . Enfin, une régulation impliquant les espèces réactives d'oxygène (ROS) sera également évoquée.

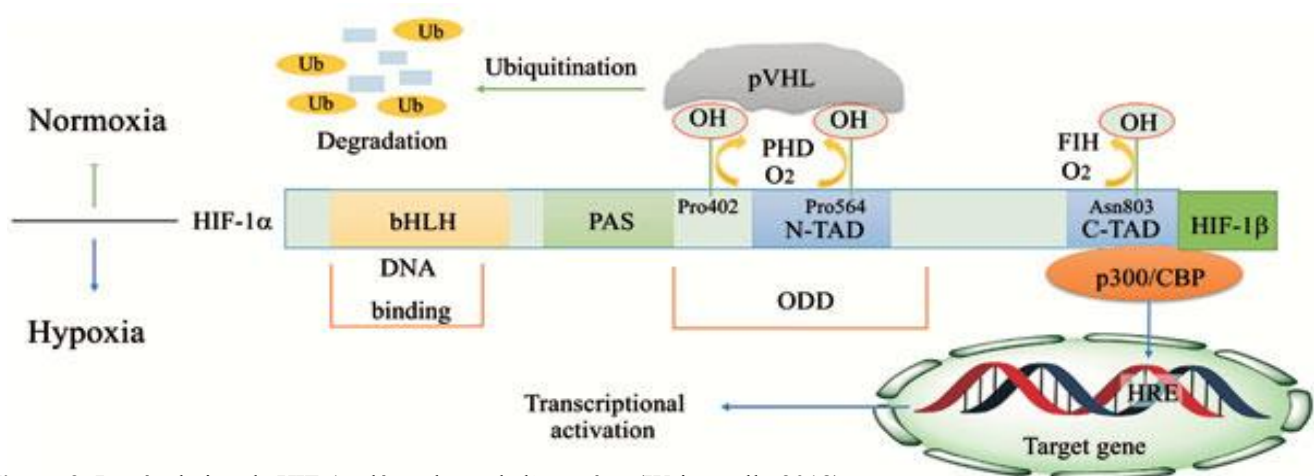


Figure 2: La régulation de HIF-1 α dépendante de l'oxygène (Wei et coll., 2018)

3.1.1. La voie pVHL- dépendante

Très instable en normoxie, HIF-1 α subit une hydroxylation permanente des prolines 402 et 564 dans le domaine ODD par des prolyl-4-hydroxylases au nombre de trois (PHD 1-3 ; Prolyl Hydroxylase Domain containing) (Masson et Ratcliffe, 2003) (Figure2). L'activité dioxygénase de ces PHD nécessite en plus de la présence d'oxygène des cofacteurs comme le fer, l' α -cétoglutarate et l'ascorbate (Epstein et coll., 2001 ; Semenza, 2003). Le niveau des ARNm codant pour ces trois PHD varie en fonction des tissus (Cioffi et coll., 2003, lieb, 2002, Masson et Ratcliffs 2003) et du niveau d'oxygène (Epstein et coll., 2001). L'isoforme PHD2 présente une plus grande spécificité pour l'hydroxylation des prolines de HIF-1 α (Huang et coll., 2002) alors que la PHD3 jouerait un rôle plus important dans la régulation de HIF-2 α . L'expression de la PHD2 est suffisante pour déstabiliser les niveaux de HIF-1 α dans des conditions normoxiques et pour déclencher la translocation de HIF-1 α dans le noyau sous une forme active (Berra et coll., 2003). L'hydroxylation des prolines se fait par les PHD situées dans le domaine ODD des HIF α et reconnues par la protéine von Hippel-Lindau (pVHL), une protéine du complexe E3 ubiquitine ligase (Ivan et coll., 2001) qui permet l'ubiquitination de HIF-1 α et qui favorise par conséquent sa dégradation par la voie du protéasome (Kamura et coll., 2000 ; Maxwell et coll., 1999). Ainsi en normoxie, HIF-1 α subit un processus permanent de dégradation impliquant son hydroxylation par le PHD et son ubiquitination par la protéine pVHL (Kimbrow et Simons, 2006)

En conditions d'hypoxie, l'hydroxylation des prolines au niveau de HIF-1 α n'ayant plus lieu, la pVHL n'est alors plus capable d'interagir avec HIF-1 α permettant ainsi l'accumulation, la stabilisation et la translocation de HIF-1 α dans le noyau. Cette dernière étape est dépendante du domaine NLS situé en position carboxy-terminal dans le domaine C-TAD (Ivan et coll., 2001 ; Jaakkola et coll., 2001 ; Kallio et coll., 1999).

Bien que l'hydroxylation des prolines joue un rôle clé dans la reconnaissance de HIF-1 α par la pVHL en normoxie, des travaux ont rapporté que l'acétylation de la lysine 532 retrouvée au niveau de l'ODD de HIF-1 α pouvait favoriser l'interaction avec la pVHL et par conséquent déstabiliser HIF-1 α (Jeong et coll., 2002, Figure 2). La protéine responsable de cette modification est l'acétyl-transférase ARD1 (Arrest Defective-1). Ainsi il a été démontré que la dégradation de HIF-1 α est accrue lorsque l'état acétylé est maintenu par la présence d'un inhibiteur global des déacetylases comme l'acide butyrique (Kim et coll., 2001). Au contraire, la stabilité de HIF-1 α est augmentée lorsque la lysine⁵³² est mutée en arginine (Tanimoto et coll., 2000) confirmant l'importance de l'acétylation de la lysine⁵³² dans la régulation de HIF-1 α .

Enfin, l'implication d'autres résidus comme la leu⁵⁶², la Tyr⁵⁶⁵, la Ser⁵⁵¹ et la Thr⁵²² a été rapportée pour faciliter l'hydroxylation de Pro⁵⁶⁴ (Ivan et coll., 2001 ; Jaakkola et coll., 2001 ; Sutter et coll., 2000).

3.1.2. Régulation de l'activité transcriptionnelle par l'hydroxylase FIH

En plus du rôle de l'oxygène sur la stabilisation de HIF-1 α (et de HIF-2 α), une régulation supplémentaire dépendante de l'oxygène mais indépendante de la pVHL existe (Masoud et coll., 2015). L'activité transcriptionnelle complète de HIF-1 nécessite les domaines N-TAD et C-TAD qui sont connus pour interagir avec des coactivateurs transcriptionnels tels que CBP / p300 et améliorer la transactivation des gènes cibles de HIF-1. Plus précisément, des analyses du domaine de transactivation T-TAD de HIF-1 α complexé avec le domaine d'interaction de CBP ou p300 ont révélé que la présence d'une asparagine en position 803 (et 847 pour HIF-2 α) participait à la stabilisation de ce complexe sur les sites HRE (A Dames et coll., 2002 ; Elkins et coll., 2003 ; Freedman et coll., 2002). Or il a été démontré que cette asparagine pouvait être hydroxylée par l'hydroxylase FIH (Factor Inhibiting HIF). L'activité d'hydroxylation de FIH qui nécessite à la fois la présence d'oxygène, de Fer II et de l' α -

cétoglutarate (Dann et coll., 2002 ; Lee et coll., 2003 ; McNeill et coll., 2002) empêche le recrutement des cofacteurs de transcription comme CBP et/ou de p300 supprimant ainsi l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α sur ces gènes cibles (Lando et coll., 2002 ; Masson et coll., 2001 ; Srinivas et coll., 1999). De manière intéressante, l'hydroxylase FIH a une constante de Michaelis (Km) plus faible pour l'oxygène que les PHD, ce qui signifie qu'elle est capable de maintenir son activité à des tensions d'oxygène plus faibles suggérant que même HIF-1 α pourrait également être déstabilisée en hypoxie. Enfin, il semble que la FIH hydroxyle plus efficacement HIF-1 α que HIF-2 α (Koivunen et coll., 2004, Bracken et coll., 2006).

3.1.3. Implication des ROS dans la régulation de HIF- 1 α

La voie de signalisation ROS/HIF-1 α a été largement décrite comme étant impliquée dans diverses pathologies incluant le cancer, les maladies inflammatoires et l'ischémie. Il est également bien connu que la signalisation des ROS *via* HIF-1 α est importante dans de nombreux processus cellulaires et en particulier dans la prolifération cellulaire et l'angiogenèse (Movafagh et coll., 2015).

Les premières études sur ce sujet avaient mis en évidence le rôle de la mitochondrie dans la stabilisation de HIF-1 α . En effet, l'absence ou la diminution de l'ADN mitochondriale dans des cellules cultivées en hypoxie ne permet plus l'accumulation de HIF-1 α (Bell et coll., 2007 ; Chandel et coll., 1998, 2000). Ainsi, la production des ROS comme l'oxyde nitrique (NO), le superoxyde (SO) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) *via* la chaîne respiratoire de la mitochondrie joue un rôle de régulateur dans l'accumulation des facteurs de transcription de la famille HIF *via* l'inhibition des PHD (Catrina, 2014, Schieber et Chandel, 2014, Chandel, 2010).

D'autres hypothèses plus récentes suggèrent que les ROS pourraient intervenir dans la stabilisation de la protéine HIF-1 α , sa transactivation, sa transcription et sa traduction indépendamment de l'oxygène en réponse à des hormones, des facteurs de croissance ou encore à des cytokines, en empruntant les voies des PI3K/Akt et PI3K/ERK/MAPK (*via* p300 ou son induction par Rac1) ou par l'intermédiaire de microARNs (Du et coll., 2011; Hielscher et Gerecht, 2014; Movafagh et coll., 2015; Sang et coll., 2003).

En normoxie, les ROS sont capables d'induire une surexpression de HIF-1 α dans de nombreux types cellulaires en modulant les hydroxylases, les kinases ou les phosphatases (Movafagh et coll.,

2015; Schieber et Chandel, 2014). La modulation des activités asparagine et proline hydroxylases par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a par exemple, un effet sur le recrutement des cofacteurs ainsi que sur la dégradation protéasomique de HIF-1 α . Ainsi, le shift du système redox vers un état réduit (en réponse à l'hypoxie) ou oxydant (en réponse aux stimuli non-hypoxiques) pourrait limiter l'activation de HIF-1 et être bénéfique pour traiter ou prévenir les cas pathologiques associés à la surexpression de HIF-1 α (Kietzmann et Görlach, 2005).

3.2. La régulation de HIF-1 α indépendante de l'oxygène

En plus du rôle majeur des hydroxylases et des mécanismes dépendants de l'oxygène impliqués dans la régulation de l'activité de HIF-1 α , il existe de nombreuses autres voies moléculaires pouvant contribuer à la régulation de HIF-1 α que ce soit en conditions de normoxie ou d'hypoxie (Figure 3).

3.2.1. Les voies de signalisation des facteurs de croissance (PI 3-kinase et MAPK)

Plusieurs études ont mis en évidence que l'activation de la voie des PI3K (phosphatidyl inositol-4,5-biphosphate-3-kinase)/AKT/mTOR qui joue un rôle majeur dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire est capable d'induire une augmentation de la traduction de la protéine HIF-1 α (Conrad et coll., 1999 ; Jiang et coll., 2001; Kline et coll., 2002). C'est l'activation d'AKT par la PI3K qui permet à mTOR de perturber l'intégrité du facteur d'initiation de traduction (dont la fonction normale est d'inhiber la traduction des ARNm dépendant de la coiffe) aboutissant à l'augmentation de la traduction de HIF-1 α (Déry et coll., 2005). Parallèlement, mTOR est capable de phosphoryler la kinase p70 S6 (S6K) qui elle-même entraîne la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 permettant au final d'augmenter la traduction de HIF-1 α . L'activation de cette voie PI3K/AKT/mTOR est par ailleurs contrôlée par le suppresseur de tumeur PTEN qui possède la capacité de déphosphoryler la PI3K et ainsi de contrecarrer l'augmentation de HIF-1 α par cette voie (Gingras et coll., 2001).

D'autres voies de signalisation impliquant les cascades de kinases RAS/RAF/MEK/ERK permettent d'augmenter la vitesse de traduction des ARNm codant pour HIF-1 α *via* la phosphorylation du facteur eIF-4E (Gingras et coll., 2001). Enfin, ERK est aussi impliqué dans l'activation

transcriptionnelle de HIF-1 α en phosphorylant le coactivateur CBP/p300 augmentant ainsi la formation du complexe HIF-1 α /p300 (Sang et coll., 2003).

Des modifications par phosphorylation et déphosphorylation ont également été proposées comme essentielles dans l'activation de HIF-1 (Semenza et coll., 1998). Par exemple, les membres de la famille des MAPK (mitogen-activated protein kinase) comme ERK1 (p44 MAPK), ERK2 (p42 MAPK) ou encore p38 MAPK sont capables de phosphoryler HIF-1 α aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* permettant d'induire l'augmentation de son activité transcriptionnelle de HIF-1 sur ses gènes cibles (Minet et coll., 2001 ; Richard et coll., 1999 ; Sodhi et coll., 2000). Ces phosphorylations entraînent des modifications importantes dans le profil de migration de la protéine confirmant bien que les MAPK induisent des modifications post-traductionnelles au niveau de HIF-1 α (Wang et coll., 1995). Cette augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α est confirmée par le fait que HIF1 β se lie préférentiellement à la forme phosphorylée de HIF-1 α (Suzuki et coll., 2001).

3.2.2. La voie Mdm2

Selon le type de cancer, la perte de la protéine suppresseur de tumeur p53 peut être corrélée à une augmentation de HIF-1 α (Bae et coll., 2002). Une des explications possibles serait qu'en normoxie la liaison de HIF-1 α à p53 par l'intermédiaire de Mdm2 (mouse double minute 2 homologue) faciliterait l'ubiquitination et la dégradation par la protéasome de HIF-1 α . Au contraire, dans une tumeur hypoxique, la perte ou la mutation dans p53 ne permettrait plus la dégradation de HIF-1 α *via* Mdm2 (Bae et coll., 2002 ; Ravi et coll., 2000).

Des études ultérieures ont cependant montré que HIF-1 α était capable de se lier directement à Mdm2 dans les cellules déficientes pour p53 en condition d'hypoxie (Chen et coll., 2003 ; Nieminen et coll., 2005) ce qui contredit l'hypothèse que p53 constituerait un intermédiaire nécessaire pour la dégradation de HIF-1 α *via* Mdm2. Chen et coll, ont par ailleurs montré en conditions d'hypoxie que : 1- l'association entre Mdm2 et HIF-1 α n'avait pas d'impact sur la stabilisation de p53 et 2- la surexpression de Mdm2 augmentait le niveau protéique de HIF-1 α ainsi que la transcription du VEGF (Chen et coll., 2003). Ces résultats suggèrent que Mdm2 est capable de stimuler la stabilisation de HIF-1 α en hypoxie et de permettre l'activation de gènes cibles de HIF-1 α conduisant ainsi à l'adaptation cellulaire tumorale et à l'angiogenèse.

3.2.3. La voie Hsp90

En 1996 une étude avait mis en évidence que l'interaction HIF-1 α avec HIF-1 β qui nécessitait les domaines bHLH-PAS était nécessaire à l'attachement du facteur de transcription sur l'ADN et à son activité fonctionnelle *in vivo* (Gradin et coll., 1996). Dans cette même étude, les auteurs montrent également que la protéine chaperonne Hsp90 (Heat Shock Protein) était capable de se lier à HIF-1 α contrairement à HIF-1 β et était nécessaire à son repliement (Gradin et coll., 1996). Peu de temps après, en 1999, Minet et coll. ont pu confirmer que HIF-1 α interagissait directement avec Hsp90 par l'intermédiaire du domaine bHLH-PAS en normoxie mais dans une moindre mesure en hypoxie (Minet et coll., 1999). Ces données montrent également qu'en condition hypoxique, Hsp90 est nécessaire pour l'activation de HIF-1 α sans toutefois être indispensable pour la translocation de HIF-1 α dans le noyau (Gradin et coll., 1996). Inversement en normoxie, une des hypothèses émises par les auteurs serait que l'interaction de Hsp90 avec HIF-1 α jouerait un rôle répresseur sur la forme active de HIF-1 α . En 2002, le traitement d'une lignée de carcinome rénale par un antagoniste de Hsp90, la geldanamycin, a montré une stimulation de l'ubiquitination et la dégradation de HIF-1 α *via* le protéasome indépendamment de l'oxygène et de la voie pVHL mettant ainsi en évidence l'existence d'une nouvelle voie de régulation de la stabilité et la fonction de HIF-1 α (Isaacs et coll., 2002). Par la suite, l'équipe de Semenza a pu identifier que RACK1, le récepteur de la protéine kinase C activée était capable de rentrer en compétition avec Hsp90 pour se lier à HIF-1 α et favoriser la dégradation de HIF-1 α de manière indépendante de l'oxygène (Liu et coll., 2007 ; Liu et Semenza, 2007).

3.2.4. La voie p53

Les données reliant p53 à HIF-1 présentent des intérêts thérapeutiques importants dans le cancer mais ne peuvent être développées ici de manière exhaustive (Fels et Koumenis, 2005). Brièvement, il a été montré qu'en réponse à l'hypoxie que HIF-1 α induisait l'accumulation de p53 qui inhibait rétroactivement sa stabilisation. Ainsi, une faible expression de p53 atténue la transactivation de HIF-1 en entrant en compétition avec p300 alors qu'une forte expression de p53 provoque la dégradation et l'inactivation de HIF-1 α . Ce système permet à p53 une fois activée dans des conditions d'hypoxie ou d'anoxie sévère de contrôler négativement les réponses dépendantes de HIF-1 α . (Ravi et coll., 2000 ; Schmid et coll., 2004). Cependant, des effets opposés de p53 ont également été rapportés selon la nature de la sous-unité HIF-1. Ainsi en conditions d'hypoxie la liaison de HIF-1 α à p53 peut

également entraîner la stabilisation de p53 et induire la mort cellulaire (An et coll., 1998 ; Moeller et coll., 2005). En revanche, HIF-2 α est capable de supprimer indirectement l'activité de p53, favorisant alors la chimiorésistance et la radiorésistance des cellules cancéreuses (Shi et coll., 2012).

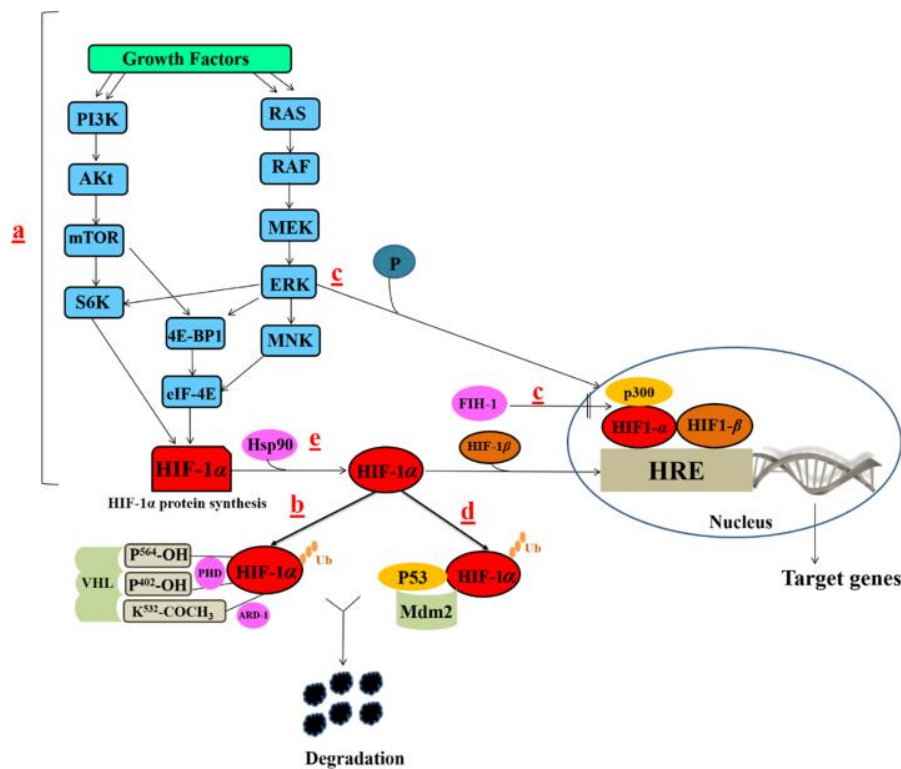


Figure 3: Les différentes voies de régulation de HIF-1 α . a, La voie des facteurs de croissance, b, Les voies liées au pVHL ; c, La voie FIH-1 ; d, La voie d'ubiquitination médiée par Mdm2-p53 et la voie de dégradation du protéasome ; e, Hsp90 lié directement avec HIF-1 α , induit des changements conformationnels dans sa structure pour s'adapter à HIF-1 β et initier sa transactivation. Ces voies régulent l'activité de HIF-1 α en régulant la synthèse de HIF-1 α (a), la stabilité de HIF-1 α (b, d, e) ou la transactivation de HIF-1 α (e, c) (Masoud et Li, 2015).

4. Gènes cibles et fonction de HIF-1 α en conditions physiologiques

Depuis la mise en évidence du rôle clé de l'interaction spécifique de l'hétérodimère HIF-1 α /HIF-1 β sur les séquences HRE localisées dans la région promotrice de l'EPO des cellules cultivées en hypoxie (Semenza 1991, Wang et coll, 1993, Wang et Semenza, 1995), un nombre très important de gènes (supérieur à 100) a été rapporté comme étant régulés par HIF-1 α (Figure 4) (Semenza 2017). La caractéristique commune à l'ensemble de ces gènes repose sur la présence dans leur région promotrice des séquences HRE nécessaires à la liaison du facteur HIF-1 α /HIF-1 β (Semenza 1991, Mazure et coll., 2004, Benizri et coll., 2008). Des analyses transcriptomiques à partir de cellules endothéliales artérielles ont ainsi rapporté que plus de 2% de l'ensemble des gènes de ces cellules sont régulés par HIF-1 α (Manalo et coll., 2005, Clottes 2005 ; Bertout et coll., 2008 ; Keith et coll., 2011).

HIF-1 α joue des rôles multiples et parfois contradictoires dans divers processus développementaux, physiologiques et physiopathologiques (Semenza, 2003 ; Wang et Semenza, 1996). Par exemple, durant l'embryogenèse, qui se déroule en grande partie à des concentrations d'oxygène comprises entre 1 et 5 %, il est bien établi que l'oxygène joue un rôle morphogène par l'intermédiaire de HIF-1 α (Dunwoodie et coll., 2009).

Etant donné le nombre très important de données issues de travaux ayant étudiés le rôle et/ou la fonction de HIF-1 α aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans de multiple processus biologiques, il est difficile d'être exhaustive. C'est pourquoi, je présenterais seulement quelques exemples illustrant l'implication de HIF-1 α dans une fonction biologique donnée.

4.1. Rôle dans l'érythropoïèse et le métabolisme ferrique

En condition d'hypoxie, les gènes de l'érythropoïèse (EPO) et du métabolisme du fer ont été décrits comme augmentés permettant de stimuler la formation des globules rouges afin d'assurer un apport suffisant d'oxygène aux tissus (Semenza et coll., 1991). Comme déjà évoqué, cette stimulation s'effectue *via* l'accumulation de HIF1- α qui par la présence de séquences HRE au niveau des promoteurs de ces gènes leur permet d'être transcrits. Parallèlement, l'hypoxie induit également une surexpression des transporteurs de fer, les transferrines (Tf) qui augmentent le transport du fer (Fe³⁺) aux cellules (Rolfs et coll., 1997), ainsi que la céruloplasmine, une ferroxidase oxydant le Fe²⁺ en Fe³⁺ (Mukhopadhyay et coll., 2000). Au total, l'augmentation de ces gènes qui est dépendant de HIF-1 α permet une augmentation de l'apport de fer vers les tissus érythroïdes (Rolfs et coll., 1997).

4.2. Rôle dans le métabolisme du glucose

En hypoxie, les cellules changent de voie métabolique du glucose en passant du cycle de l'acide tricarboxylique (dépendante de l'oxygène) vers la glycolyse indépendante de l'oxygène (production de 2 ATP). Parce que cette voie indépendante de l'oxygène produit dix-neuf fois moins d'ATP que la voie dépendant de l'oxygène à partir d'une molécule de glucose, les cellules hypoxiques doivent parallèlement augmenter leur capacité à absorber le glucose pour produire une quantité équivalente d'ATP qu'en normoxie (Dang et Semenza, 1999). Dans ce but, HIF-1 α induit la surexpression de toutes

les enzymes glycolytiques ainsi que des transporteurs de glucose comme GLUT1 et GLUT3 (Chen et coll., 2001 ; Wenger, 2002). Lu et coll., ont également décrit l'existence d'une potentielle boucle de rétroaction positive puisque les métabolites du glucose comme le lactate et le pyruvate sont capables d'induire en normoxie l'accumulation de HIF-1 α et de réguler l'expression de gènes induits par l'hypoxie (Lu et coll., 2002).

4.3. Rôle dans l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus physiologique de croissance de vaisseaux sanguins qui constitue une étape cruciale au cours du développement embryonnaire (et lors de la croissance tumorale). L'angiogenèse est stimulée par un grand nombre de gènes de réponse à l'hypoxie (Levy et coll., 1995 ; Bunn et Poyton, 1996 ; Giordano et Johnson, 2001 ; Semenza et coll., 2002, Forsythe et coll., 1996). Parmi ces gènes, le VEGF (Vascular endothelial cell growth factor) représente le mitogène le plus important pour recruter et stimuler la prolifération des cellules endothéliales au niveau des zones hypoxiques (Conway et coll., 2001 ; Joško et coll., 2000 ; Neufeld et coll., 1999). Son action en combinaison avec d'autres facteurs proangiogéniques régulés par HIF-1 α provoque une réponse pléiotrope qui contribue à la formation de néo-vaisseaux aboutissant à une augmentation de la densité vasculaire et par conséquent à une diminution de la distance de diffusion d'oxygène (Rey et Semenza, 2010).

Les autres gènes régulés par HIF-1 α et impliqués dans la régulation de l'angiogenèse codent pour l'oxyde nitrique synthétase (NOS2), l'hème oxygénase 1, l'endotheline 1 (ET1), l'adrénomedulline (ADM) et le récepteur adrénérgique α_{1B} (Eckhart et coll., 1997 ; Hu et coll., 1998 ; Lee et coll., 1997 ; Melillo et coll., 1995 ; Nguyen et Claycomb, 1999). Enfin HIF-1 α régule des gènes impliqués dans le métabolisme de la matrice et dans la maturation des vaisseaux comme les métalloprotéases (MMPs), les récepteurs et les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAIs) et les prolyl hydroxylases du collagène (Ben-Yosef et coll., 2002 ; Kietzmann et coll., 1999 ; Takahashi et coll., 2000, Takeda et coll., 2004).

Des données obtenues sur des cellules embryonnaires de souris (mESC) ont mis en évidence que HIF-1 α pouvait jouer un rôle dans l'induction de la différenciation des ESC vers la lignée vasculaire. Cette différenciation repose sur la suppression de l'expression du gène Oct4 *via* la liaison

directe de HIF-1 α sur trois des quatre HRE inversés (reverse HRE, rHRE) (Mazure et coll, 2002 ; Narravula et Colgan, 2001) présents dans le promoteur de Oct4. De plus, la différenciation des ESC vers la lignée vasculaire, qui est induite par l'hypoxie et associée à l'augmentation de VEGF, est inhibée lorsque le VEGF ou HIF-1 α est bloqué. Cette étude confirme donc que HIF-1 α joue un rôle important dans l'angiogenèse et représente un axe essentiel dans l'induction de la différenciation de la lignée vasculaire (Lee et coll., 2012). D'autres études utilisant des modèles d'ischémie confirment que HIF-1 α joue un rôle clé dans la détermination du destin cellulaire des cellules souches embryonnaires. En effet, la différenciation des ESC en cellules endothéliales en hypoxie implique l'activation par HIF-1 α du facteur de transcription Etv2 connu pour réguler la vasculogenèse et l'angiogenèse (Abedin et coll., 2014 ; De Val et Black, 2009 ; Oikawa et Yamada, 2003 ; Shi et coll., 2014). Enfin, il est intéressant de noter que HIF-1 α est impliqué à un autre niveau dans la spécification des cellules endothéliales en cellules endothéliales artérielles par l'activation de la voie Notch (Tsang et coll., 2017).

4.4. Rôle dans l'hématopoïèse et l'immunité

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont maintenues dans un microenvironnement hypoxique au niveau de la moelle osseuse et sont majoritairement en état de quiescence. Ainsi, les CSH localisées dans ces niches hypoxiques stabilisent leur niveau intracellulaire de HIF-1 α (Takubo et coll., 2010). En revanche, les CSH de souris déficientes pour HIF-1 α perdent leur état de quiescence et entrent en cycle. Lorsque ces souris déficientes pour HIF-1 α subissent un stress (transplantation, myélo-suppression, âge), il a été montré que le nombre de CSH diminue dans ces souris déficientes par rapport à des animaux témoins. Enfin, la stabilisation de HIF-1 α provoquée par la perte de l'ubiquitine ligase E3 pour HIF-1 α (VHL) induit une quiescence des CSH et de leurs progéniteurs tout en altérant leurs capacités à être transplantées (Takubo et coll., 2010). Ces données indiquent donc qu'*in vivo*, la quiescence des CSH est contrôlée par la régulation précise des niveaux protéiques intracellulaires de HIF-1 α .

On notera qu'entre autre, HIF-1 α a également des fonctions dans la mise en place des lignées lymphocytaire B (Kojima et coll., 2002), dans la différenciation lymphocytaire T (Dang et coll., 2011) et plus généralement dans l'immunité (Zinkernagel et coll., 2007 ; Hellwig-Bürgel et coll., 2005).

4.5. Rôle dans le développement neural

Outre l'absence de vascularisation céphalique observée chez les embryons déficients pour HIF-1 α au jour 8.5 de gestation, ces animaux présentent des différences morphologiques importantes par rapport aux animaux témoins (absence de fermeture du tube neural notamment). En particulier, l'absence de HIF-1 α provoque une réduction du nombre de somites et la formation anormale de plis neuraux en degré élevé d'hypoxie (Ryan et coll., 1998). Il est intéressant de noter que la délétion homozygote de HIF-1 β entraîne également une mort *in utero* des embryons entre les jours 9,5-10,5 de gestation. Ces embryons présentent des anomalies de fermeture du tube neural ainsi qu'une hypoplasie du cerveau antérieur (Kozak et coll., 1997). Même si par ces deux études, il apparaît donc clairement que HIF-1 α et/ou HIF-1 β sont impliqués dans le développement du système nerveux central, des études ultérieures utilisant des modèles murins d'inactivation conditionnelle de HIF-1 α dans les cellules souches neurales (CSN) ont permis de préciser le rôle de HIF-1 α dans le développement du SNC (Tomita et coll., 2003, Wagenführ et coll., 2015, 2016, Lange et coll., 2016). Cette thématique sera développée plus en détail dans le chapitre II.

4.6. Rôle dans la prolifération et survie cellulaire

L'hypoxie *via* l'accumulation de HIF-1 α induit la sécrétion des facteurs de croissance comme l'IGF2 (Insulin Like Growth Factor-2) et le TGF- α (Transforming Growth Factor- α) qui une fois liés à leur récepteur respectif activent différentes voies de transduction qui stimulent la prolifération cellulaire, la survie cellulaire mais également l'expression de HIF-1 α (Feldser et coll., 1999 ; Krishnamachary et coll., 2003). En particulier, on retrouve les voies des MAPK et des PI3K déjà décrites comme capables de stimuler la prolifération et la survie cellulaire (Kennedy et coll., 1997, Seger et Krebs, 1995 ; Pagès et coll., 1993). L'implication de ces voies est d'autant plus importante qu'elles peuvent jouer un rôle déterminant dans la progression tumorale (Semenza, 2003).

4.7. Rôle dans les phénomènes apoptotiques

Bien que HIF-1 α stimule la prolifération et la survie cellulaire comme précédemment décrit, HIF-1 α de par ses interactions avec p53 et les protéines associées à p53 (voir chapitre I 3.2.4) joue

également paradoxalement un rôle dans l'activation des voies apoptotiques (Carmeliet et coll., 1998). Ainsi, l'hypoxie stimule l'activation de la caspase 3 et de l'Apaf-1 *via* la caspase 9 et la sécrétion du cytochrome c dans différents types cellulaires (Brunelle et Chandel, 2002 ; McClintock et coll., 2002). Au contraire, la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est réprimée en hypoxie (Carmeliet et coll., 1998). Il a également été montré que les niveaux d'expression de HIF-1 α et HIF-1 β sont significativement corrélés avec la caspase-3, Fas et le Fas-ligand (Volm et Koomagi, 2000). p53 est également impliquée dans la régulation de l'apoptose induite par l'hypoxie *via* l'induction de l'expression de gènes liés à l'apoptose tels que Bax, Noxa, Puma et Perp (Carmeliet et coll., 1998; Schuler et Green, 2001).

4.8. Autres fonctions ciblées

Depuis que HIF-1 a été identifié comme un régulateur de la transcription induite par l'hypoxie du gène de l'érythropoïétine humaine (EPO), beaucoup d'attention a été apportée à ce facteur de transcription de par son rôle critique dans une multitude de processus développementaux, physiologiques et physiopathologiques (Semenza, 2003 ; Wang et Semenza, 1996). En dehors des rôles déjà évoqués précédemment, HIF-1 α est aussi impliqué de nombreux autres processus physiologiques comme par exemple, l'adipogenèse (Yun et coll., 2002), la myogenèse (Yang et coll., 2017), l'ostéogenèse (Wang et coll., 2007), la chondrogenèse (Schipani et coll., 2001) et la cardiomyogenèse (Kudová et coll., 2016). Cette liste non exhaustive illustre l'importance et le rôle central que joue HIF-1 α au cours du développement.

5. HIF-1 α et cancer

5.1. HIF-1 dans les tissus tumoraux

Il existe de nombreuses preuves que les tumeurs solides rencontrent fréquemment un stress hypoxique. Les cellules cancéreuses à prolifération rapide prolifèrent hors de leur réseau vasculaire, limitant ainsi la diffusion de l'oxygène dans la tumeur. Le stress hypoxique peut également être causé par des défauts de perfusion résultant d'une structure et d'une fonction anormale des vaisseaux sanguins. Il n'est donc pas surprenant que les tumeurs solides présentent souvent des niveaux élevés de HIF-1 α (Bertout et coll., 2008 ; Majmundar et coll., 2010).

De nombreuses analyses immunohistochimiques sur des biopsies provenant de patients atteints de différents cancers ont permis d'établir que la surexpression d'HIF-1 α était retrouvée presque systématiquement au niveau des tumeurs de tous types confondus. Sa localisation intracellulaire est majoritairement nucléaire (Tableau 2). Cette surexpression qui conduit souvent à une augmentation des métastases constitue un mauvais pronostic et reste largement associée à un fort taux de mortalité comme décrit dans le tableau 3. Par exemple, l'association entre la surexpression de HIF-1 α et la mortalité a été observée dans les cancers du sein, de l'oropharynx, des ovaires, de l'endomètre et du cerveau (oligodendrogliome) (Birner et coll., 2001 ; Bertout et coll., 2008 ; Keith et coll., 2011 ; Semenza, 2011). Cependant malgré ces associations entre la surexpression de HIF-1 α et la mortalité, la corrélation de ces deux phénomènes n'est pas toujours retrouvée. Par exemple, chez les patients atteints d'un cancer cervical cette association entre l'expression de HIF-1 α et la progression de la tumeur n'est observée que dans les stades précoces de la tumeur (Birner et coll., 2000). Dans les cancers de la tête et du cou ainsi que dans les cancers du poumon non à petites cellules, CPNPC), la surexpression de HIF-1 α semble être associée à une diminution de la mortalité (Beasley et coll., 2002 ; Volm et Koomägi, 2000). Cependant, la surexpression de HIF-1 α n'est pas le seul facteur à prendre en compte pour prédire la survie des patients. Par exemple une étude sur le cancer ovarien a mis en évidence que la surexpression de HIF-1 α est corrélée avec l'apoptose dans la plupart des tumeurs et que la combinaison de l'apoptose et de la surexpression de HIF-1 α est associée à une augmentation de la survie du patient. Cependant, dans les cancers de l'ovaire qui surexpriment à la fois HIF-1 α et une forme mutée de p53 (associé à une demi-vie plus longue que p53), les niveaux d'apoptose étaient retrouvés faibles et étaient associés à une diminution significative de la survie globale des patients (Birner et coll., 2001). Autre exemple, dans le cas de patients atteints d'un cancer de l'œsophage, la surexpression à la fois de HIF-1 α et de Bcl2 est associée à une mauvaise réponse à la thérapie (Koukourakis et coll., 2001). Ainsi, ces quelques exemples mettent en évidence que la surexpression de HIF-1 α reste dépendante du type de cancer et que la présence ou l'absence d'altérations génétiques retrouvées dans les cellules tumorales peuvent affecter l'équilibre entre les facteurs pro et anti- apoptotiques (Semenza et coll., 2003).

Parmi les tumeurs cérébrales, le glioblastome multiforme (GBM), également connu sous le nom d'« astrocytome de grade 4 », est la tumeur primitive du cerveau la plus fréquente et la plus invasive (voir chapitre III). Les régions hypoxiques fréquemment retrouvées dans le GBM favorisent le phénotype malin des cellules cancéreuses qui le constituent (Rong et coll., 2006, Hsieh et coll 2011). Dans les GBM, l'expression de HIF-1 α est fortement corrélée au grade tumoral (Zagzag et coll., 2000).

Sa surexpression a été mise en cause dans la physiopathologie de la maladie (Yang et coll., 2012). De manière intéressante, Zagzag et coll. ont pu déterminer que HIF-1 α est localisée dans les cellules tumorales infiltrantes du GBM (Zagzag et coll., 2000).

De par ses gènes cibles, HIF-1 α agit comme un activateur de l'invasion tumorale, de la progression tumorale, de l'angiogenèse, de la résistance aux traitements et du maintien du phénotype de cellules souches cancéreuses (Bao et coll., 2012 ; Merighi et coll., 2006 ; Zagzag et coll., 2006). L'augmentation des niveaux de HIF-1 α dans le GBM primaire est aussi liée à la perte de fonction de PTEN et au gain de fonction du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Zhong et coll., 2000 ; Zundel et coll., 2000). Au contraire, les gliomes de bas grade expriment des niveaux inférieurs de HIF-1 α à ceux retrouvés dans les gliomes de haut grade.

Type de Cancer	Localisation de l'expression de HIF-1 α
Cancer de la vessie	Nucléaire, cytoplasmique (Très faible)
Cancer de sein	Principalement dans le noyau des métastases et dans tous les compartiments cellulaires
Cancer cervical	Exclusivement nucléaire
Cancer du colon	Nucléaire
Cancer colorectal	Restreinte au cytoplasme et au noyau des cellules métastatiques
Cancer endométrial	Péri-nécrotique
Carcinome cellulaire squameux de l'œsophage	Faible dans le cytoplasme et forte dans le noyau des cellules tumorales
Cancer stromale gastro-intestinal	Nucléaire
Cancer du tête et du cou	Zones péri-nécrotique sévèrement hypoxiques
Cancer laryngeal	Nucléaire et cytoplasmique mixée
Cancer de foie	Noyau des cellules cancéreuses à côté des sites de nécrose
Cancer des poumons	Cytoplasmique en normoxie et nucléaire en hypoxie
Cancer de l'ovaire	Nucléaire
Cancer de l'ovaire	Cytoplasmique
Cancer rénal	Nucléaire dans les cellules tumorales
Gliome	Noyau des cellules cancéreuses autour des sites de nécrose
Mélanome	Cytoplasmique et nucléaire
Oligodendrogliomes	Cellules tumorales

Tableau 2: Localisation cellulaire de la surexpression de HIF-1 α dans des cancers humains déterminée par IHC à partir de Biopsies tumorales des patients (Soni et coll., 2017).

Localisation de la tumeur	Localisation de l'expression de HIF-1 α	Effet sur la survie du patient
Cancer cervical, stade précoce	Exclusivement nucléaire	↑ mortalité
Cancer cervicale, Radiothérapie	N.D.	↑ mortalité
tête cou (carcinome épidermoïde) après chirurgie	N.D.	↓ mortalité
Endomètre	Péri-nécrotique	↑ mortalité
Oligodendrogliomes	Cellules tumorales	↑ mortalité
Oropharyngé	N.D.	↑ mortalité et résistance aux radiations
Ovaire	Nucléaire	↑ mortalité (avec p53 mutée)
Œsophage, stades précoces	N.D.	↑ mortalité et résistance à la thérapie (avec Bcl2)
Poumon (non petite cellules)	N.D.	↓ mortalité
Sein	Nucléaire dans les métastases	↑ mortalité
Tumeur gastro-intestinal	Nucléaire	↑ mortalité

Tableau 3: Association de la surexpression de HIF-1 α estimée par une analyse immunohistochimique sur des biopsies de différents types de tumeur avec la survie des patients (Adapté de Semenza 2003 et de Soni et coll., 2017).

L'implication de HIF-1 α dans la pathologie cancéreuse joue un rôle majeur dans la progression tumorale. Il est d'autant plus important quand son expression est généralement corrélée avec le grade de la tumeur comme c'est le cas notamment dans les gliomes. L'impact de HIF-1 α dans le glioblastome sera décrit par la suite dans le chapitre III.

5.2. Les aspects de la progression tumorale régulés par HIF-1 α

Les fonctions de HIF-1 α dans la biologie du cancer sont multiples. Il contribue à la progression tumorale et au développement du cancer. Parmi les nombreuses fonctions de HIF-1 α impliquant l'activation d'une multitude de gènes regroupés dans la Figure 5, certaines se révèlent avoir une importance de tout premier ordre au regard de la progression tumorale. Parmi celles-ci, nous retrouvons : la transition épithéliale mésenchymateuse (TEM) incluant l'invasion et la formation de métastases, l'angiogenèse tumorale, la survie et la prolifération tumorale et le métabolisme tumoral.

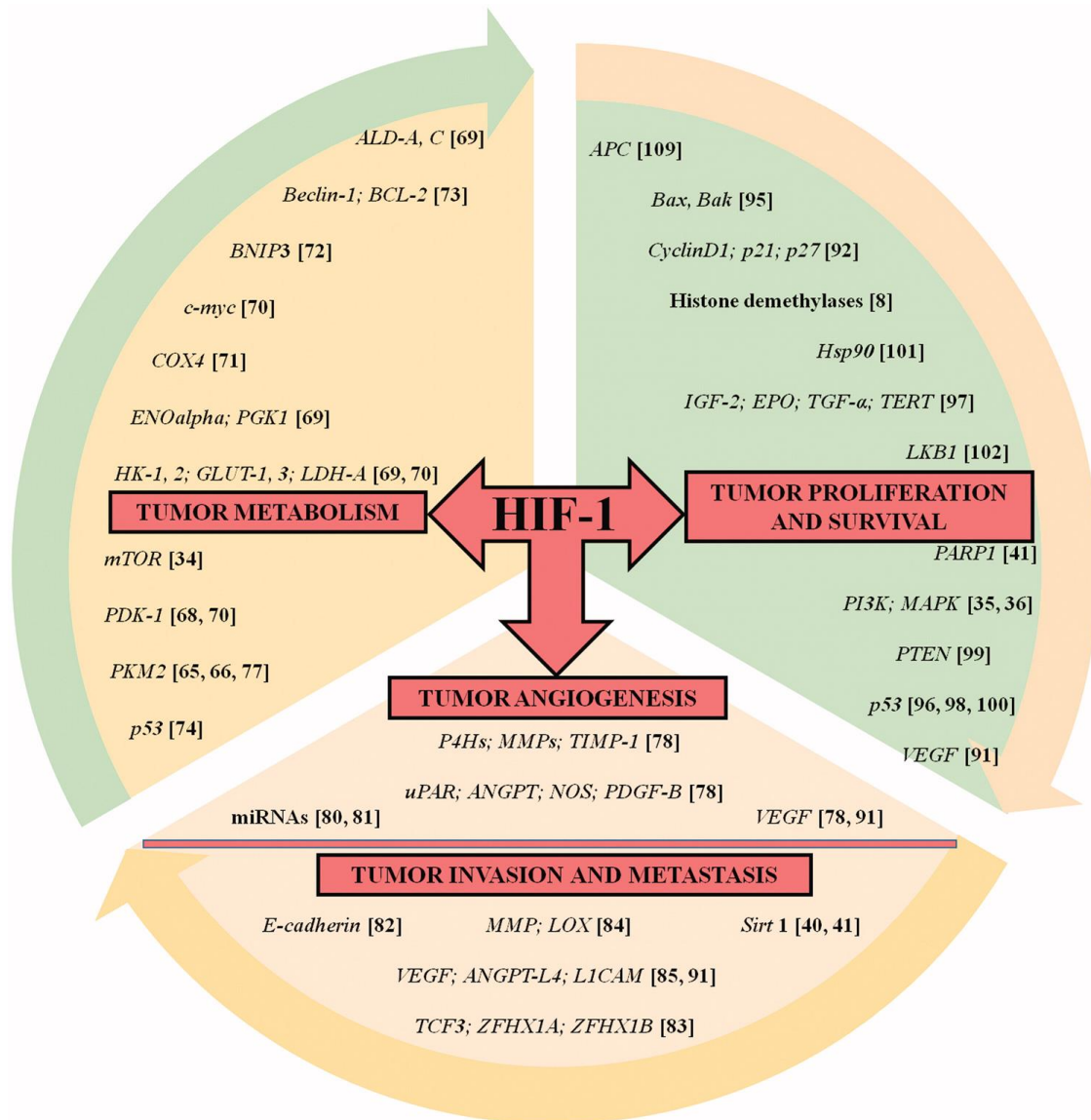


Figure 5: Les gènes régulés par HIF-1 ayant un impact dans la tumorigénèse. Les gènes cibles de HIF-1 α présentés ici sont impliqués dans des processus tels que le métabolisme cellulaire, la prolifération et la survie, l'angiogénèse, l'invasion et la métastase des cellules tumorales (Soni et coll., 2017).

5.2.1 La transition épithéliale mésenchymateuse (TEM) et la métastase tumorale

La transition épithéliale mésenchymateuse (TEM) est une caractéristique des cellules cancéreuses invasives pouvant aussi être associée à la perte des contacts intercellulaires. Dans ce cas de figure, la cellule acquiert un aspect mésenchymateux et une augmentation de sa motilité. De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de HIF-1 dans l'expression des régulateurs de la TEM aboutissant à terme à la formation de métastases tumorales (Zhang et coll., 2014 ; Krishnamachary et coll., 2006). Par exemple, l'expression de HIF-1 α dans le cancer augmente

l'invasion et induit la perte de l'E-cadhérine (Zhang et coll., 2014). Le niveau de cadhérine est indirectement régulé par HIF-1 α qui lorsque cette dernière s'accumule au niveau nucléaire active la transcription de gènes qui répriment l'expression des E-cadhérines (Krishnamachary et coll., 2006). Parallèlement, HIF-1 α active l'expression d'autres protéines comme TCF3, ZFHX1A, ZFHX1B, et TWIST impliquées dans la formation d'un cytosquelette rigide et dans l'adhésion intercellulaire (Yang et coll., 2008, Krishnamachary et coll., 2006). HIF-1 α régule aussi la transcription des gènes comme la lysyl-oxidase (Lox) et les métallo-protéases (MMP) nécessaires à la dégradation de la matrice extracellulaire ce qui entraîne son remodelage régulant ainsi l'invasion et la métastase tumorale (Wong et coll., 2011). HIF-1 α régule également le VEGF qui est impliqué à la fois dans l'induction de l'intravasation correspondant au passage des cellules cancéreuses dans les vaisseaux sanguins ainsi que dans l'activation de gènes codant pour des molécules d'adhésion cellulaire comme L1CAM impliquées dans l'extravasation (passage des cellules cancéreuses de la circulation sanguine vers un tissu où les cellules vont proliférer) (Zhang et coll., 2012).

5.2.2. L'angiogenèse tumorale

Comme la TEM, l'angiogenèse joue un rôle important dans la progression tumorale (Rey et coll., 2010). Le lien crucial entre l'hypoxie et l'angiogenèse a été la découverte que l'hypoxie était capable d'induire l'expression du facteur de croissance VEGF (Morfoisse et coll., 2014). Dans le cancer pancréatique, l'activation de HIF-1 α induit la sécrétion de VEGF contribuant ainsi à la formation des vaisseaux sanguins (Azoitei et coll., 2016). Le rôle de la régulation transcriptionnelle du VEGF par HIF-1 α /HRE dans les cellules tumorales est démontré par de nombreuses études (Masoud et Li, 2015). Par exemple, il a été montré à partir de tumeurs de cellules souches embryonnaires que le niveau de VEGF produit était identique entre les tumeurs VEGF^{-/-} et les tumeurs HRE^{-/-}, confirmant que HIF-1 α régule la transcription de VEGF (Tsuzuki et coll., 2000). En conditions pathologiques (ischémie, diabète) le flux sanguin est régulé par la modulation de la tonalité vasculaire *via* l'induction de gènes HIF-1 α dépendants codant pour les régulateurs de croissance angiogéniques. Ceci inclus le récepteur activateur du plasminogène de type urokinase (uPAR) qui module le métabolisme de la matrice, des angiopoïétines 1 et 2 (Angiopoietine 1 et 2) et les gènes régulant la tonalité vasculaire comme NOS/ VEGF et PDGF-B (Bosch-Marce et coll., 2007 ; Mace et coll., 2007 ; Liu et coll., 2008). D'autres facteurs comme les prolyl-4-hydroxylases, les métallo-protéases de la matrice (MMP) et les inhibiteurs des MMP (TIMP-1) sont régulés par HIF-1 α et jouent un rôle dans l'angiogenèse tumorale

(Rey et coll., 2010). *In vivo*, Lee et coll ont montré que la délétion de HIF-1 α inhibe la vascularisation tumorale (Lee et coll., 2009). Dans les tissus non cancéreux, l'insuffisance de PHD2 (qui entraîne la dégradation de HIF-1 α), rétablit le système vasculaire assurant une meilleure oxygénation et une réduction des métastases (Mazzone et coll., 2009).

5.2.3. La survie et la prolifération cellulaire et l'apoptose

L'accélération de la prolifération et la diminution de la mort cellulaire causée par l'expression des facteurs de survie et de croissance cellulaire sont également des facteurs majeurs à prendre en compte dans la tumorigenèse. Le VEGF, déjà décrit précédemment comme un régulateur important de l'angiogenèse tumorale, est aussi impliqué dans la prolifération cancéreuse (Barak et coll., 2011). HIF-1 α est aussi bien capable de bloquer la mort cellulaire et de stimuler la prolifération cancéreuse ou au contraire, d'induire l'apoptose *via* la régulation du cycle cellulaire (cyclin D1, p21 et p27 ; Kumar et coll., 2015). L'induction de l'apoptose par HIF-1 α dépend de la concentration d'oxygène. Ainsi alors que des concentrations de 1 à 3% ne provoquent pas d'apoptose, celle-ci est induite lorsque les concentrations d'oxygène descendent en dessous de 0.5% (Santore et coll., 2002). L'apoptose induite par une hypoxie sévère implique l'activation de p53 par HIF-1 α qui provoque l'expression des protéines BAK et BAX, stimulant ainsi la cascade pro-apoptique entraînant le relargage du cytochrome C (Li et coll., 2015).

Il existe également une régulation réciproque positive entre HIF-1 α et l'Insulin-like Growth Factor 2 (IGF-2) aboutissant à l'augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire. L'insuline et les facteurs de croissance IGF-1, et IGF-2 induisent l'expression de HIF-1 α nécessaire pour l'expression des gènes codant pour IGF-2, IGFBP-2 et IGFBP-3. Ce mécanisme impliquant la surexpression de HIF-1 α dans les cellules tumorales contribue à une boucle de facteurs de croissance autocrine ayant des effets sur la survie et la prolifération cellulaire (Feldser et coll., 1999). D'autres facteurs de croissance ont été décrits comme étant régulés par HIF-1 α dans plusieurs types de cancers : le TGF α dans le carcinome rénal (Gunaratnam et coll., 2003), le VEGF dans le cancer colorectal, gastrique et pancréatique (Forsythe et coll., 1996 ; Dallas et coll., 2007) et l'endothéline (EDN1) dans le cancer de sein, le cancer ovarien et le cancer de prostate (Wulfig et coll., 2003 ; Grimshaw et coll., 2007). Enfin, d'autres facteurs comme c-Myc et la survivine ont été corrélés avec l'expression de HIF-1 α et associés à la prolifération et à la survie cellulaire dans le cancer du poumon (Takasaki et coll., 2016).

5.3. Les stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses impliquant HIF-1 α

Il existe une fréquence remarquable d'altérations génétiques communes dans les cellules cancéreuses qui sont associées à une augmentation de l'expression de HIF-1 α . De plus, l'expression de HIF-1 α favorise l'activation de nombreuses voies de signalisation qui sont elles-mêmes impliquées dans la tumorigenèse. Enfin, les altérations génétiques en association avec l'hypoxie tumorale sont également responsables de l'augmentation de l'expression des gènes activés par HIF-1 α dans différents cancers (Semenza et coll., 2002).

Dans le but de produire des thérapies anticancéreuses efficaces contre HIF-1 α , son inhibition doit être réalisée à différents niveaux de régulation (Semenza et coll., 2012). Actuellement, un nombre croissant de composés chimiques capables d'inhiber la prolifération cellulaire *in vivo* dans des modèles de xénogreffe ont été mis en évidence (Figure 6). Ces effets délétères sur la croissance tumorale sont à mettre en relation avec l'inhibition de l'activité de HIF-1 α dans une grande variété de mécanismes moléculaires comprenant :

- l'inhibition de son expression (l'aminoflavone AFP-464 ; Terzuoli et coll., 2010),
- l'inhibition de sa synthèse (inhibiteurs mTOR, rapamycines, glycosides ou la 2-méthoxyestradiol qui ciblent les microtubules ; Carbonaro et coll., 2011 ; Zhang et coll., 2008),
- l'augmentation de sa dégradation (inhibiteurs de HSP90 et les anti-oxydants ; Gao et coll., 2007 ; Liu et coll., 2007),
- la diminution de son hétérodimérisation avec HIF-1 β (Acriflavine qui se lie au domaine PAS-B de HIF-1 α et HIF-2 α et qui bloque l'interaction avec HIF-1 β ; Lee et coll., 2009b),
- l'inhibition de sa liaison à l'ADN (Doxorubicin ; Lee et coll., 2009a),
- et enfin la diminution de son activité transcriptionnelle *via* le domaine carboxy-terminal agissant avec le co-activateur p300 (inhibiteur du protéasome comme le Bortezomib ; Molineaux, 2012).

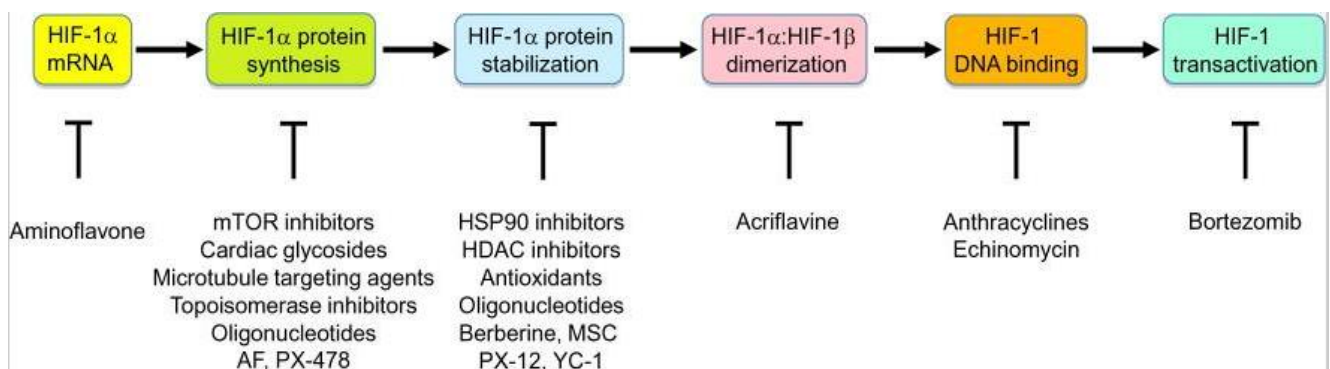


Figure 6: Mécanisme d'action moléculaire des médicaments qui inhibent HIF-1. Les étapes requises pour la transactivation des gènes cibles par HIF-1 sont montrées dans les ovals colorés et les molécules pharmacologiques qui inhibent chaque étape sont indiquées en dessous. Abréviations : HDAC, Histone Déacetylase, AF, aminoflavone, MSC, Séméthylsélénocystéine (d'après Semenza, 2012).

Un rapport récent (Ban et coll., 2016) classe les inhibiteurs de HIF en deux principaux types : les régulateurs directs et indirects de HIF-1α. Les régulateurs directs de HIF-1α inhibent l'interaction entre HIF-1α et p300 sans affecter les niveaux protéiques de HIF-1α. Les régulateurs indirects suppriment l'activité transcriptionnelle de HIF-1 induite par l'hypoxie en réduisant le taux de protéine en inhibant sa traduction (tels que le PX-478, le 2-méthoxyestradiol, l'inhibiteur de mTOR, l'everolimus, les inhibiteurs de PI3K la Wortmanin et le LY294002) ou par sa déstabilisation (les dérivés de LW6, de sulfonamide et de geldanamycine) (Masoud et Li, 2015). D'une manière intéressante, certains composés comme YC-1 inhibe la voie HIF à la fois directement (Li et coll., 2008) et indirectement (Chun et coll., 2001).

Plusieurs molécules pharmacologiques font l'objet d'essais pré-cliniques et cliniques ou sont déjà appliquées dans des protocoles thérapeutiques contre le cancer et d'autres pathologies toutefois, peu de données existent à l'heure actuelle concernant les effets secondaires induits par ces composés. Ainsi, d'autres études précliniques et cliniques devront être menées pour cibler au mieux les voies de signalisation les plus appropriées pour obtenir une inhibition efficace de HIF et prévenir des effets secondaires.

II. Développement du cortex embryonnaire et neurogenèse

Le développement des organismes pluricellulaires implique des processus fondamentaux complexes finement régulés. Ces régulations sont d'autant plus nécessaires lorsqu'elles organisent les premières phases du développement pour constituer les tissus primitifs (ectoderme, endoderme et mésoderme) qui prendront une part importante dans le développement harmonieux du cerveau. La formation des tissus fonctionnels nécessite la présence des cellules multipotentes capables de se diviser pour générer à la fois des cellules souches progénitrices qui maintiendront le stock de cellules souches et d'autre part des cellules destinées à se différencier en de nombreux types cellulaires. Ainsi, les cellules souches dont découlent l'ensemble des cellules sont là pour assurer un apport cellulaire nécessaire au développement mais aussi pour le maintien de l'intégrité de chaque organe à l'âge adulte.

Nous nous intéresserons dans ce chapitre plus particulièrement aux mécanismes impliqués dans la neurogenèse et le développement du cortex embryonnaire.

1. Le cortex cérébral

1.1. Origine du cortex cérébral

Le développement du système nerveux s'initie sous la forme d'une plaque neurale qui s'invagine pour former la gouttière neurale qui en se repliant sur elle-même donne naissance au tube neural composé de cellules neuroépithéliales (Gammill et Bronner-Fraser 2003). Dès que la formation du tube neural est achevée, des constriction apparaissent et délimitent trois vésicules cérébrales primaires qui se modifient ensuite pour former les cinq vésicules cérébrales secondaires : le myélocéphale, le métencéphale, le mésencéphale, le diencéphale et le télencéphale qui formera le cortex cérébral (Figure 7, Ishikawa et coll., 2012).

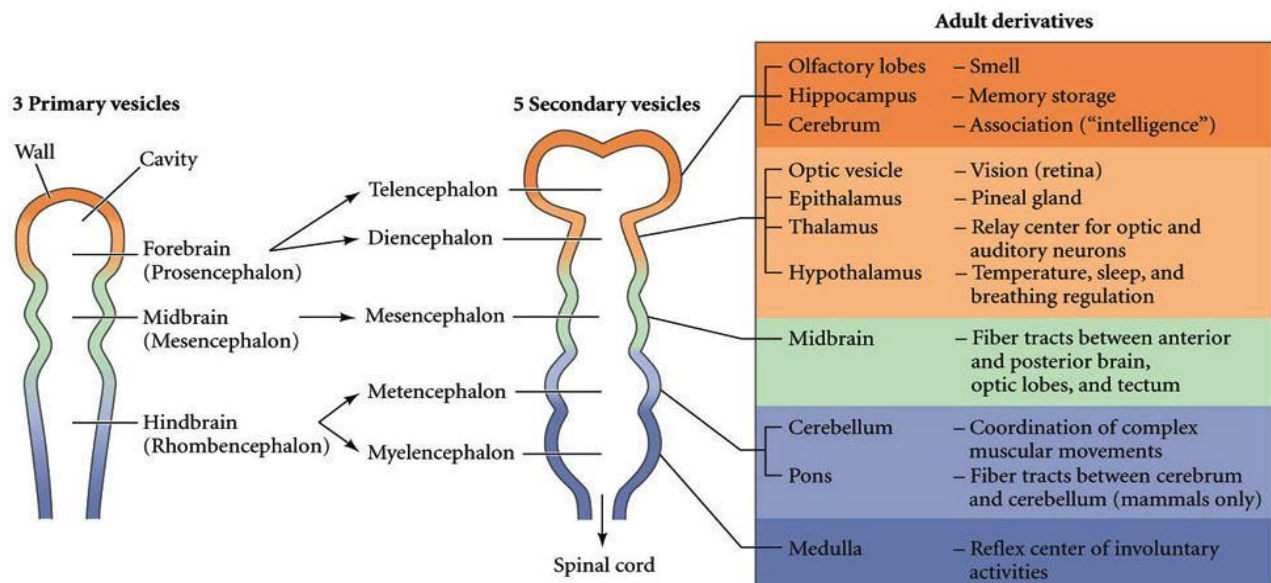


Figure 7: Les différentes parties du système nerveux central : spécification régionale du cerveau en développement. La cavité formée par la fermeture du tube neural forme le système ventriculaire. La partie antérieure du tube neural est formée de trois puis de cinq vésicules qui vont générer les structures du système nerveux central.

1.2. Structure du cortex cérébral

Le cortex est divisé en six couches horizontales (L1-L6 qui contiennent chacune des cellules bien définies (Jones, 1994), (Figure 8). Au début de sa formation, le cortex est constitué de cellules sub-piales connues sous le nom de pré-plaque. Ensuite, les cellules qui formeront la couche corticale la plus profonde (la couche VI) migrent vers la pré-plaque, où elles pénètrent et divisent le cortex en deux couches : une zone marginale supérieure et une sous-plaque inférieure (Marin-Padilla et coll., 1978). Une stratification des neurones corticaux se met en place de manière à ce que les neurones les plus anciens de la pré-plaque, se trouvent dans la couche I (dérivée de la zone marginale) et les plus récents dans la couche VI (cellules dérivées de la sous-plaque (Gilmore et Herrup, 1997)) (Figure 8).

Dans le cortex en développement, deux zones de prolifération cellulaire sont décrites : la zone ventriculaire (ZV) formée des cellules souches neurales en intense prolifération et la zone sous-ventriculaire formée des cellules issues de la ZV. Les neurones formés dans la ZV et la ZSV vont ensuite migrer dans la zone intermédiaire (ZI) puis rejoindre la plaque corticale (PC). Au cours de leur migration vers la PC, les cellules suivent des voies de différenciation (neurogenèse et gliogenèse) et de migrations multiples (Guillemot et coll., 2005). Il est important de noter que les paramètres pouvant

influencer les cellules neuroépithéliales retrouvées dans la zone ventriculaire néocorticale pourront affecter le comportement des progéniteurs neuronaux (Götz et Huttner, 2005).

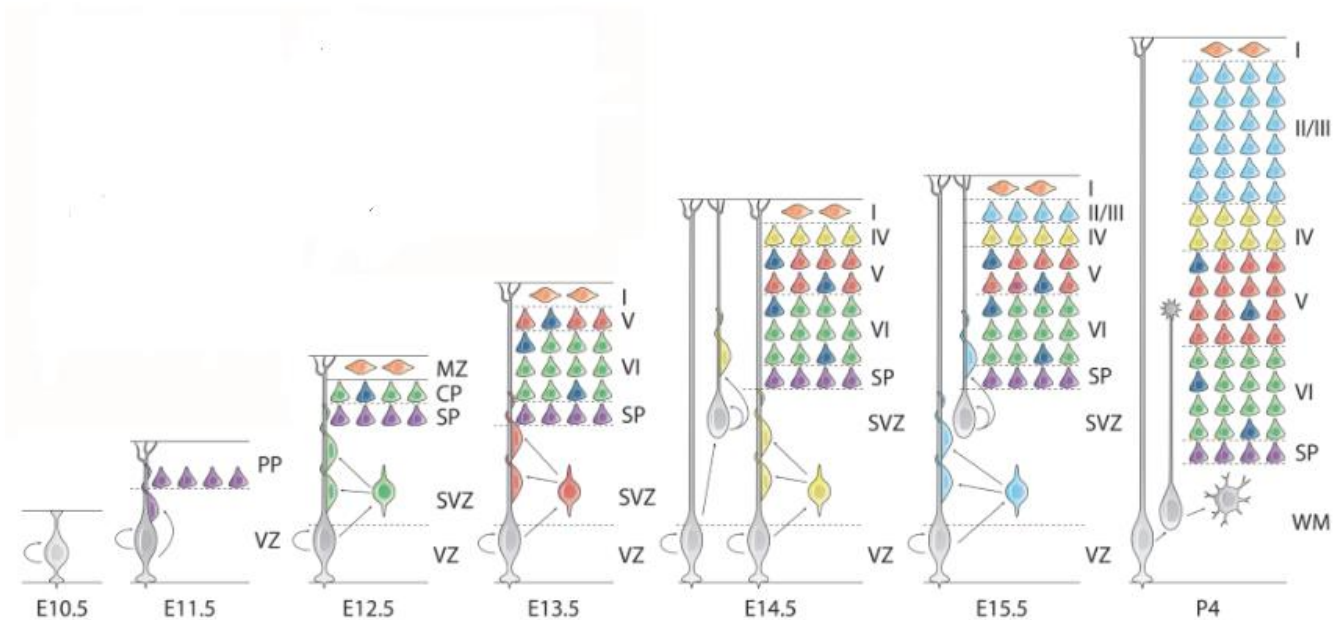


Figure 8: Structure du cortex cérébral murin en développement. Les différentes couches apparaissent progressivement avec la progression de la neurogenèse. PP : Pré-plaque, ZV : Zone ventriculaire, ZSV : Zone sous-ventriculaire, PC : Plaque Corticale, ZM : Zone « Mantle » (adapté de Woodworth et coll., 2012).

2. La neurogenèse

La neurogenèse est l'ensemble des processus physiologiques qui conduisent à partir de cellules souches nerveuses à la formation des trois principaux types cellulaires du cerveau : les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes (Alvarez-Buylla et coll., 2001 ; McKay et coll., 1997). Elle s'opère *via* une différenciation des cellules souches en progéniteurs, capables de s'autorenouveler pour accroître le nombre de progéniteurs. Ces progéniteurs dotés d'un potentiel de différenciation réduit par rapport aux cellules souches, vont subir des cycles d'amplification, puis des cycles de productions des différents types cellulaires directement ou *via* la génération de progéniteurs intermédiaires (Farkas et Huttner 2008).

Chez la souris, la neurogenèse commence à E9-E10 jours embryonnaires lorsque les cellules neuroépithéliales acquièrent des caractéristiques associées aux cellules de la glie radiaire (GR) (Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009). A E10,5 jours de développement, les neurones corticaux néoformés vont former la plaque sous-corticale localisée dans la surface superficielle du cortex.

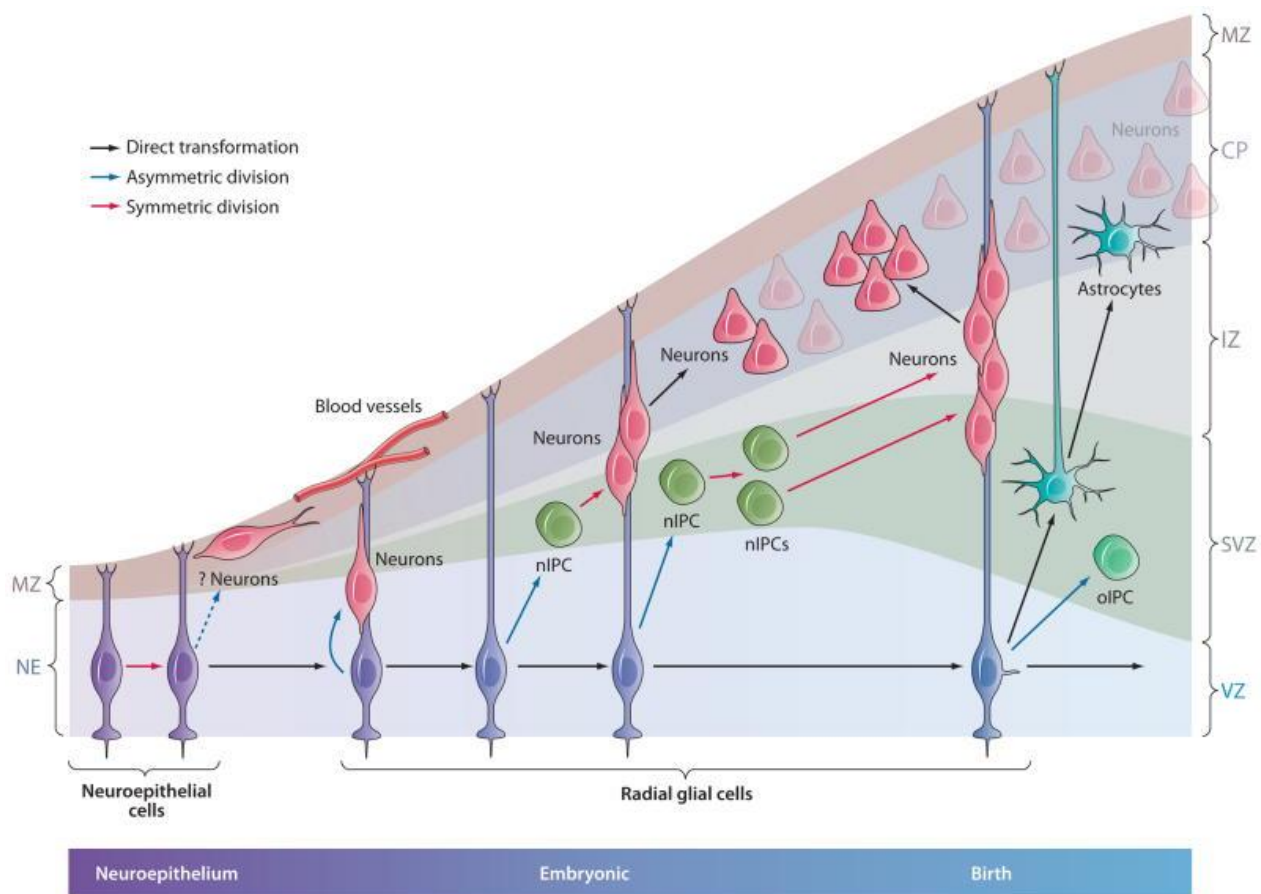


Figure 9: Neurogenèse embryonnaire chez la souris. Au début du développement, les cellules neuroépithéliales se divisent symétriquement pour augmenter leur nombre à la surface neuroépithéliale. Certaines d'entre elles donnent naissance à des neurones précoces. Les cellules de la glie radiaire génèrent des neurones : (a) directement par une division asymétrique ; (b) indirectement par la production des CPI (Cellules Progéniteurs Intermédiaires) neurogéniques et une série d'amplification ; (c) indirectement aussi par la production des CPI neurogéniques mais avec deux séries de division et plus d'amplification pour augmenter la taille du cortex. Ces progéniteurs intermédiaires génèrent aussi les oligodendrocytes. (d) La formation des astrocytes s'effectue par le détachement des cellules de la glie radiaire du côté apicale. (e) Une partie des cellules de la glie radiaire restent attachées pour maintenir le caractère souche après la naissance et permettre si nécessaire de reformer des neurones et des oligodendrocytes PC, Plaque Corticale ; ZI, Zone Intermédiaire ; ZM, Zone Marginale ; nCPI, Cellules Progéniteurs Intermédiaires neurogéniques ; GR, Glie Radiaire ; ZSV, Zone Sous-Ventriculaire ; ZV, Zone Ventriculaire (Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009).

A E11,5, les neurones initialement présents dans la plaque sous-corticale (pre-plate, PP) migrent pour former la plaque corticale. Les neurones formés entre E11,5 et E14,5 sont destinés aux couches profondes du néocortex alors que ceux qui sont produits plus tard entre E14,5 et E17,5 migrent au-delà des neurones précoces pour atteindre les couches superficielles de la plaque corticale (Uzquiano et coll., 2018) assurant ainsi une neurogenèse dite "inside-out". Une partie des cellules filles produites par les progéniteurs neuraux se transforme en progéniteurs intermédiaires qui migrent loin de la zone ventriculaire et exécutent des divisions symétriques dans la zone sous-ventriculaire contribuant à la formation des neurones des couches superficielles. Vers E17,5, la gliogenèse prend place et assure la formation des astrocytes et des oligodendrocytes (Urbán et Guillemot, 2014). Au total, le

développement cortical embryonnaire implique tout un ensemble de processus cellulaires mis en place par une grande variété de sous-populations cellulaires. La Figure 9 récapitule la cinétique d'apparition des différents types cellulaires impliqués dans la neurogenèse embryonnaire.

Outre la neurogenèse embryonnaire, il existe également une neurogenèse dans le cerveau adulte qui, même si elle reste limitée en comparaison à la neurogenèse embryonnaire, est importante pour générer des neurones ou oligodendrocytes fonctionnels. Cette neurogenèse retrouvée dans le cerveau adulte des mammifères s'effectue principalement dans la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux et dans la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (Alvarez-Buylla et Garciverdugo 2002, Gross et coll., 2000). Il a été estimé en 2013, qu'environ 700 nouveaux neurones sont renouvelés par jour chez l'homme au niveau de l'hippocampe (Spalding et coll, 2013).

3. Les différents types de progéniteurs neuraux et les neurones post-mitotiques

Deux types de progéniteurs agissent lors de la neurogenèse et de la gliogenèse : les progéniteurs apicaux (PA) qui regroupent les cellules neuroépithéliales (NE) et les cellules de la glie radiaire apicale (GRa), et les progéniteurs dit basaux qui rassemblent les cellules de la glie radiaire basales (GRb) et les progéniteurs intermédiaires (PI) (Uzquiano et coll., 2018).

3.1. Les progéniteurs apicaux

3.1.1. Les cellules neuroépithéliales

Les cellules neuroépithéliales (NE) forment le tube neural au début de la neurogenèse (Guillemot, 2005) et sont localisées dans la ZV. Elles possèdent une polarité apico-basale avec un attachement à la fois au niveau basal et apical (côté ventriculaire). Les noyaux de ces NE exécutent une migration dite intercinétique qui consiste en un mouvement de va et vient dans la ZV en relation avec le cycle cellulaire (Bertipaglia et coll., 2017 ; cf chapitre II 5.2). C'est grâce à ce cycle cellulaire dynamique que le maintien d'un épithélium pseudo-stratifié dans la zone ventriculaire est assuré (Götz et Huttner, 2005). Parallèlement à cette migration nucléaire, les NE subissent dans la ZV des divisions

symétriques prolifératives qui permettent à la fois leur amplification et l'amplification du pool des progéniteurs neuraux (Farkas et Huttner, 2008).

La transition des NE de l'état prolifératif vers l'état neurogénique s'effectue au début de la neurogenèse à E10-E12 (Götz et Huttner, 2005 ; Malatesta et coll., 2000 ; Matsuzaki et Shitamukai, 2015). Les NE se transforment progressivement en cellules de glie radiaire apicales (GRa) ayant une orientation cellulaire prédominante de progéniteurs neuraux (Malatesta et coll., 2000 ; Noctor et coll., 2004). La transition de la prolifération symétrique neuroépithéliale vers la prolifération asymétrique neurogénique nécessite un contact basal des cellules de la GR avec les méninges ainsi que les voies de signalisation de l'acide rétinoïque (Kriegstein et Alvarez-Buylla 2009). Cette transition NE→GRa s'accompagne de l'expression d'un transporteur du glutamate GLAST, considéré comme un marqueur de la glie radiaire et des astrocytes (Shibata et coll., 1997 ; Hartfuss et coll., 2001 ; cf chapitre GLAST). Au niveau cellulaire, les jonctions serrées présentes au niveau des NE sont remplacées par des jonctions adhérentes dans les GRa (Aaku-Saraste et coll., 1997 ; Stoykova et coll., 1997). Cette transition NE→GRa représente une étape importante pour la mise en place du pool de progéniteurs qui assurera ensuite la production des neurones. Ainsi, la constitution de ce pool de progéniteurs est déterminant pour la production neuronale finale et donc de la taille du cortex (Fernandez et coll., 2016).

3.1.2. Les cellules de la glie radiaire apicale

Comme les cellules NE, les cellules de la glie radiaire apicales (GRa) maintiennent une polarité apico-basale, bordent le ventricule latéral et sont associées à une migration intercinétique nucléaire. Leurs prolongements permettent aux neurones nouvellement formés de migrer vers la plaque corticale (Rakic et coll., 2007). Elles expriment des marqueurs moléculaires dont certains spécifiques du lignage glial comme la nestine (chapitre II 4.5), la vimentine, Pax6 (chapitre II 4.3) (Paired box 6 protein), la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) (Choi, 1988 ; Mori et coll., 2005) et GLAST (GLutamate ASpartate Transporter, cf chapitre II 4.4). Par comparaison avec les NE, les GRa se divisent aussi symétriquement pour proliférer mais présentent un pouvoir prolifératif plus restreint (Figure 10a). Elles apparaissent au début de la neurogenèse à E12-E13 chez la souris et donnent naissance aux neurones de manière directe (Figure 10b) ou par l'intermédiaire des progéniteurs basaux (Figure 10c) (Götz et Barde, 2005). Elles sont considérées comme des cellules souches neurales car elles ont la capacité à la fois de s'autorenouveler et/ou de se différencier. Les GRa sont localisées en position apicale. Elles subissent des divisions plutôt verticales (ou symétrique) dans le télencéphale dorsal chez la souris alors

que chez les primates, leur division est plutôt horizontale (ou asymétrique) afin de générer la glie radiaire basale (GRb) et une zone neurogénique retrouvée spécifiquement chez les primates dénommée oSVZ (outer SVZ ou SVZ externe, LaMonica et coll., 2013).

Comme précédemment évoqué, les GRb sont capables de s'autorenouveler en se divisant de manière symétrique pour constituer un stock important de progéniteurs. Ce type de division symétrique est prédominant dans les stades précoces de développement cortical embryonnaire. Les GRb ont également la possibilité de se diviser asymétriquement. Il existe deux modes de divisions asymétriques : une division directe qui produit un neurone et une GR et une neurogenèse indirecte qui produit des progéniteurs intermédiaires basaux qui vont se diviser à leur tour de manière symétrique pour produire deux neurones (Haubensak et coll., 2004 ; Zhou et coll., 2012 ; Miyata et coll., 2004 ; Noctor et coll., 2004). Ces neurones immatures migrent alors le long des fibres radiales pour atteindre la plaque corticale (Noctor et coll., 2007). La capacité des fibres radiales de jouer le rôle d'intermédiaire durant la différenciation des progéniteurs en neurones a été démontrée à la fois *in vivo* et *in vitro* (Götz et Barde, 2005).

3.2. Les progéniteurs basaux

3.2.1. Les progéniteurs intermédiaires

Les progéniteurs intermédiaires (PI) sont des progéniteurs basaux qui sont produits par des divisions asymétriques des cellules de la glie radiaire et qui migrent par la suite dans la ZSV (Noctor et coll., 2004 ; Haubensak et coll., 2004 ; Miyata et coll., 2004). Ces progéniteurs qui ont perdu la polarité apico-basale et qui ne présentent plus de migration intercinétique (Takahashi et coll., 1995), initient l'expression du phénotype neuronal avant même d'entrer en mitose (Attardo et coll., 2008). Ils forment la zone sous-ventriculaire par la mise en place de mitoses dites apicales (Miyata et coll., 2004 ; Noctor et coll., 2008). Leurs divisions exclusivement symétriques contribuent à la neurogenèse (en produisant deux nouveaux PI à partir d'un PI, figure 10c) ainsi qu'à la production de la majorité des projections neuronales corticales (Haubensak et coll., 2004 ; Attardo et coll., 2008).

3.2.2. Les cellules de la glie radiaire basale

Comme les PI, les cellules de la glie radiaire basale (GRb) sont produites au début de la neurogenèse à partir de la GRa (Ostrem et coll., 2017) et sont localisées au niveau basal de la zone sous-ventriculaire. Alors qu'elles représentent chez la souris moins d'1% des progéniteurs corticaux, elles sont retrouvées en plus grand nombre chez les espèces gyrencéphaliques (Shitamukai et coll., 2011 ; Wang et coll., 2011). Chez les primates, ces cellules produites par des divisions horizontales semblent être importantes pour le renouvellement et l'expansion des progéniteurs de la zone oSVZ. Les GRb sont généralement attachées à la membrane basale mais ne présentent pas d'extension apicale caractéristique des GRa (Fietz et coll., 2010 ; Hansen et coll., 2010 ; Reillo et coll., 2011 ; LaMonica et coll., 2013 ; Martínez-Martínez et coll., 2016).

Comme les cellules GRa de la ZV, les cellules GRb de la ZSV se divisent de manière symétrique et asymétrique ce qui conduit d'une part à leur autorenouvellement et d'autre part à la production de progéniteurs intermédiaires et de neurones permettant au final d'augmenter la production neuronale (Hansen et coll., 2010, Wang et coll., 2011). Il a ainsi été suggéré que le repliement et la taille du cortex dépendrait non seulement de l'abondance relative des cellules de la glie radiaire et des progéniteurs intermédiaires, mais aussi de la prolifération équilibrée des cellules de la glie radiaire basale (McKenna et coll., 2011).

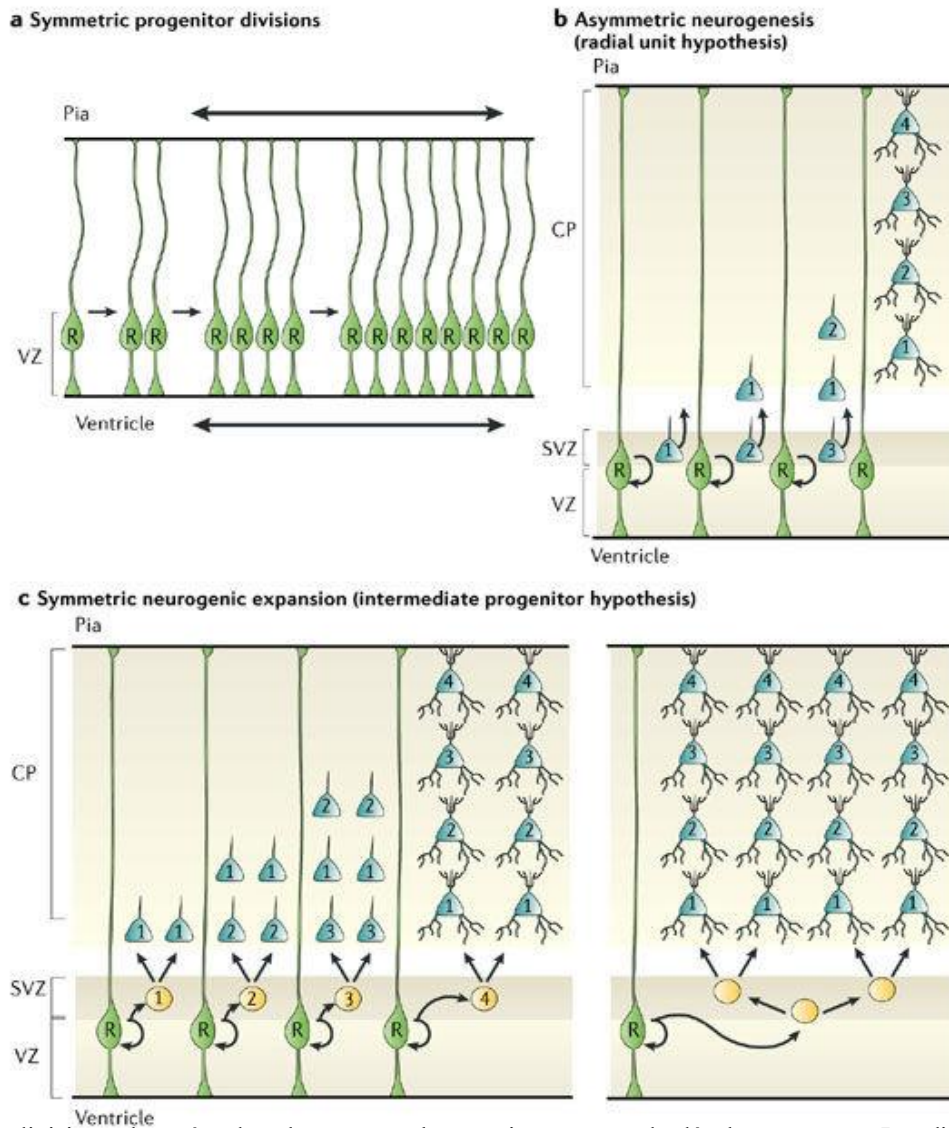


Figure 10: Les divisions observées dans le cortex embryonnaire au cours du développement. a, Les divisions progénitrices symétriques des GRa dans la zone ventriculaire (ZV) augmentent la population fondatrice (glie radiale (R), verte). b, Les divisions neurogéniques asymétriques dans la ZV permettent l'autorenouvellement les cellules de la glie radiale et la production des neurones (bleus) destinés aux différentes couches de la plaque corticale (PC), résultant ainsi en un réseau dit radial ou en colonnes de neurones. c, L'illustration de gauche montre des divisions neurogéniques symétriques des progéniteurs intermédiaires (jaune) dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) résultant de l'amplification de PI identique et du même âge (illustré par des nombres dans les cellules). L'illustration de droite montre que des divisions progénitrices symétriques supplémentaires à partir de PI peuvent avoir lieu dans la ZSV avant que des divisions neurogéniques terminales amplifient encore le nombre de neurones corticaux générés pour une couche corticale donnée, sans nécessiter la présence de plus de cellules gliales radiales dans la ZV. Les cellules numérotées de 1 à 4 représentent la progéniture neuronale produite par quatre divisions de cellules gliales radiales séquentielles (Kriegstein et coll., 2006).

3.3. Les neurones post-mitotiques

La production des neurones se fait par deux manières différentes : directement à partir de la division asymétrique des cellules de la glie radiaire ou indirectement à partir de la division symétrique des progéniteurs intermédiaires (Haubensak et coll., 2004).

Une fois générés, les neurones néoformés vont devoir migrer vers leur place définitive au sein du cortex. Deux grands modes de migration neuronale sont décrits : la migration radiale (locomotion) et la migration tangentielle (Figure 11).

La migration radiale est effectuée par les neurones produits dans la ZV qui migrent le long des fibres de la glie radiaire pour arriver à leur destination finale (Hatten et coll., 1999). Les cellules qui empruntent cette voie de migration donnent principalement des neurones glutamatergiques pyramidaux excitateurs. Les mécanismes de migration des neurones corticaux semblent différer dans la phase précoce de la neurogenèse. En effet, entre les jours embryonnaires E12 et E13, les neurones néoformés dans la zone ventriculaire présentent une extension (ou processus) cellulaire attachée à la surface piaie du cerveau (basale). Son raccourcissement progressif permet à l'ensemble de la cellule de migrer vers la surface piaie, indépendamment de la glie radiale. Ce mécanisme de migration cellulaire qui est appelé translocation somale permet de former la pré-plaque corticale (Gupta et coll., 2002).

Le deuxième mode de migration repose sur une migration dite tangentielle. Cette migration tangentielle est principalement utilisée par les interneurones produits dans les ganglions de la base, qui migrent tangentiellement pour intégrer le cortex. En effet, il a été démontré que la grande majorité des interneurones GABAergiques trouvée dans le cortex cérébral de la souris sont générés dans les ganglions de la base (Lavdas et coll., 1999, Anderson et coll., 1997). Ces interneurones naissent dès E11 dans l'éminence ganglionnaire médiale (EGM) et migrent vers le télencéphale dorsal. En revanche, chez les humains et les primates, les interneurones sont principalement générés dans le cortex tandis qu'une petite fraction est produite dans le sous-pallium (Letinic et coll., 2002). Il faut noter qu'une fois arrivés dans le cortex, ces interneurones ont la capacité d'adopter une migration radiale pour atteindre leur localisation terminale au niveau des couches corticales.

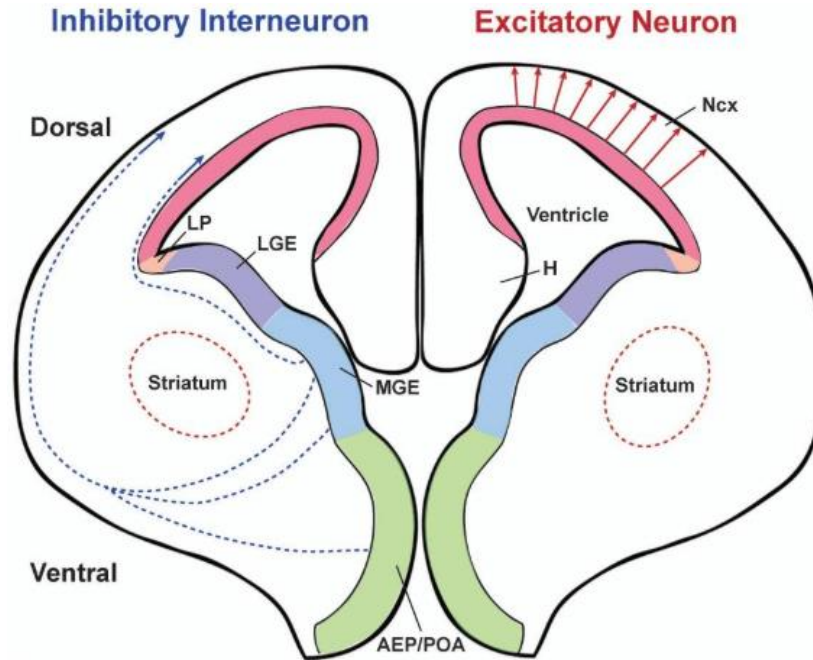


Figure 11: Origines distinctes des neurones excitateurs et des interneurons inhibiteurs dans le néocortex de souris en développement. Les neurones excitateurs sont générés dans la zone proliférative du télencéphale dorsal puis migrent radialement vers la plaque corticale (flèches rouges). En revanche, les interneurons inhibiteurs sont produits dans la zone proliférative du télencéphale ventral et migrent tangentiellement pour atteindre le néocortex suivant deux voies principales (flèches en pointillés bleus). Les régions colorées indiquent les zones prolifératives retrouvées au niveau du cerveau embryonnaire et exprimant différents facteurs de transcription qui sont essentiels pour la neurogenèse. AEP : zone entopédonculaire antérieure ; H : hippocampe ; EGL : éminence ganglionnaire latérale ; PL : pallium latéral ; EGM : éminence ganglionnaire médiale ; Ncx : néocortex ; POA : zone pré-optique (Tan et Shi, 2013).

4. Les marqueurs des progéniteurs neuronaux

Comme évoqué précédemment, la neurogenèse embryonnaire implique au cours du temps la production et/ou la différenciation de nombreuses populations neurales. À l'heure actuelle, il existe des marqueurs cellulaires spécifiques qui permettent d'identifier ces différentes populations cellulaires, de les localiser et de suivre leur progression au cours du temps dans le cortex en développement (Figure 12) (Zhang et Jiao 2015). La transition des cellules souches neurales vers des états plus différenciés (NE→GR→PI→neurone) s'accompagne de l'expression différentielle et séquentielle de nombreux marqueurs cellulaires s'appuyant sur l'expression de filaments intermédiaires du cytosquelette (Nestine, GFAP, ...), de protéines de transport (Glast...) ou bien encore de facteurs nucléaires de transcription (Sox2, Pax6, Tbr2, Tbr1, ...) (Englund et coll., 2005 ; Ohtsuka et coll., 2011). Ainsi chaque type cellulaire présente un profil particulier d'expression de marqueurs permettant *in fine* de les identifier. Je

présenterai ici les quelques marqueurs utilisés durant ma thèse pour suivre l'évolution des différentes populations cellulaires dans un cerveau embryonnaire en développement déficient pour HIF-1 α .

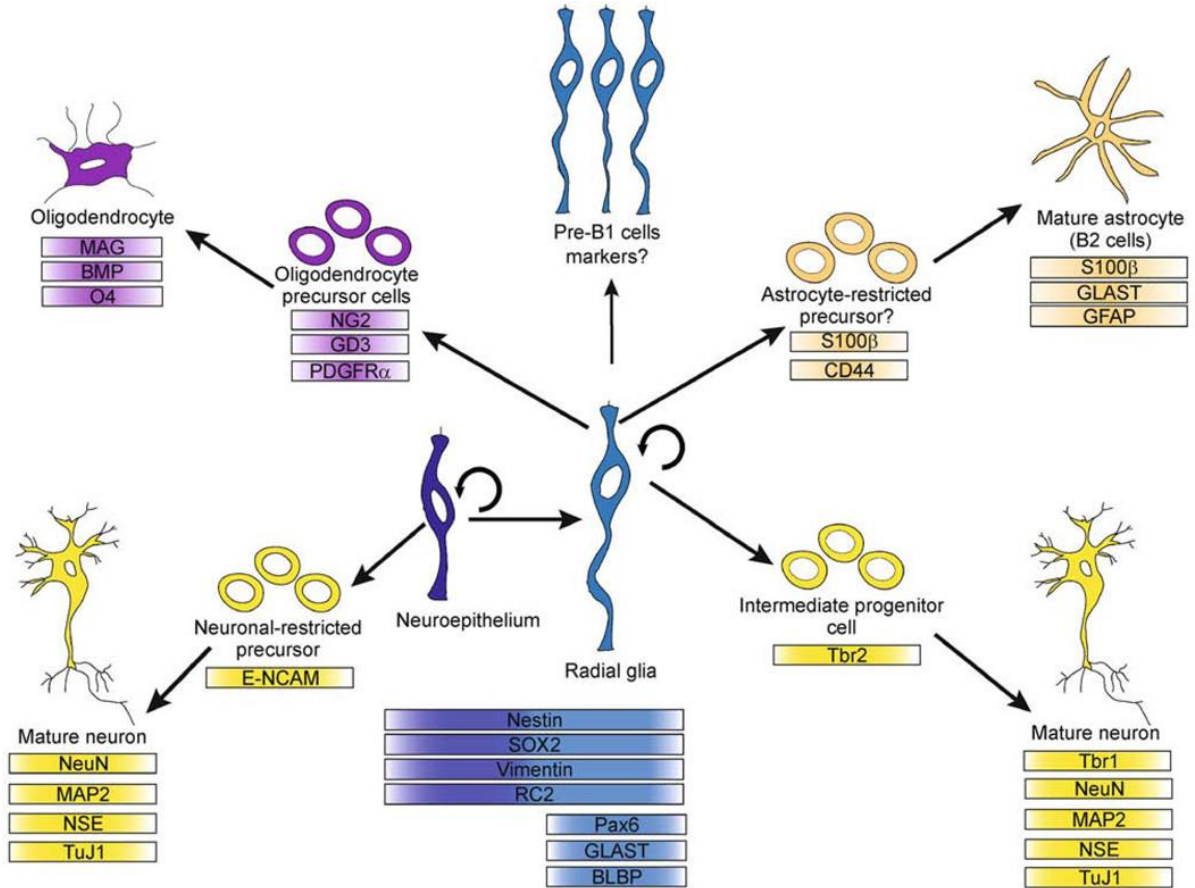


Figure 12: Lignées de cellules neuronales embryonnaires et profils d'expression de marqueurs. Les cellules neuroépithéliales (CNE) sont les premiers progéniteurs neuraux qui produisent des neurones et qui donnent aussi naissance aux cellules gliales radiales (GR), qui à leur tour agissent en tant que progéniteurs primaires au cours du développement cortical. Ces cellules peuvent produire des oligodendrocytes, des astrocytes et des neurones. Alors que les précurseurs des oligodendrocytes et des neurones ont été caractérisés, l'existence d'une cellule précurseur restreinte aux astrocytes reste à démontrer. Les cellules GR produisent également des cellules pré-B1 entre E13,5-15,5 qui restent relativement quiescentes jusqu'à la réactivation postnatale (Rushing et Ihrie, 2016).

4.1. La nestine

Le gène de la nestine code pour une protéine de filament intermédiaire de type VI fortement exprimée dans les cellules progénitrices neurales (Sunabori et coll., 2008, Frederiksen et McKay, 1988) à la fois dans les cellules souches neuroépithéliales (Urban Lendahl et coll., 1990) et dans les cellules de la glie radiale (Hockfield et McKay, 1985). La nestine est également exprimée dans d'autres types de cellules neurales comme les cellules de l'épendyme (Lendahl et coll., 1990) et les cellules activées B1 (Rushing et Ihrie, 2016). Son expression au cours du développement embryonnaire chez la souris est démontrée dans la Figure 13. Pendant la neurulation, les cellules du neuroectoderme deviennent

positives à la Nestine. Lors de la différenciation terminale, les cellules du système nerveux central n'expriment plus la Nestine, Chez l'adulte, son expression peut être cependant induite en situation pathologique comme par exemple lors de la formation de la cicatrice gliale après une lésion du système nerveux central (Michalczyk et Ziman 2005). La nestine a été montrée comme jouant un rôle important dans le développement du système nerveux central notamment dans les mécanismes de repliement de la plaque neurale et la formation de la glie radiaire favorisant au final la migration des neurones néoformés (Rakic et coll., 1972). Les données de Park et coll. suggèrent également que la nestine est primordiale pour la survie et l'autorenouvellement des CSN (Park et coll., 2010).

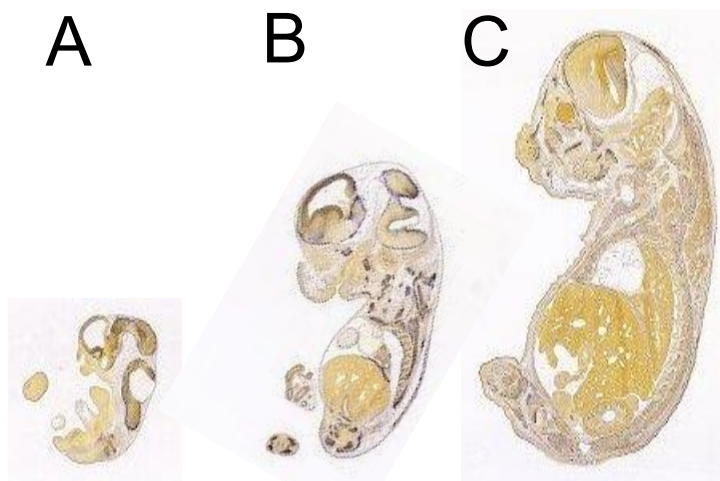


Figure 13: Hybridation *in situ* des ARNm codants pour la nestine à différents stades de développement embryonnaire chez la souris : E11,5 (A), E13,5 (B) et E15,5 (C) (Allen Brain atlas : <http://www.brain-map.org/>)

4.2. Sox2

Les gènes Sox (Sex determining region Y-box) appartiennent à la famille des facteurs de transcription liés au groupe à haute mobilité (HMG ; Episkopou, 2005). Il existe plus d'une vingtaine de protéines Sox qui sont classées en huit sous-familles (Sox A-H) en fonction des homologies de séquences dans leurs domaines HMG. Sox2 qui appartient à la sous-famille B (Wegner et Stolt, 2005) est fortement exprimée dans les cellules neuroépithéliales du cerveau embryonnaire en développement (Figure 14) où il a été montré comme nécessaire pour la prolifération et le maintien des cellules souches neurales ainsi que pour la détermination du devenir cellulaire (Episkopou, 2005). Une étude *in vitro* menée en 2011 montre que la délétion hétérozygote de Sox2 entraîne des déficits prolifératifs qui sont retrouvés dans des pathologies humaines attribuées à la déficience de Sox2 comme l'anophtalmie, l'épilepsie et la malformation de l'hippocampe. Cette étude montre également que la déficience totale

de *sox2* entraîne une sortie du cycle cellulaire des cellules souches neurales qui est associée à la réduction d'expression d'autres marqueurs des progéniteurs neuraux comme la nestine et *Blbp* (Gómez-lópez et coll., 2011). L'électroporation d'embryons de poulets avec une construction dominante négative pour *Sox* qui affecte les activités de *Sox1*, *Sox2* et *Sox3* montre qu'au moins un membre de la famille *Sox* est nécessaire pour empêcher un engagement prématuré vers la différenciation. Alternativement, il suffit qu'un seul gène *Sox* (*Sox1*, *Sox2* ou *Sox3*) soit exprimé pour empêcher la différenciation neuronale (Bylund et coll., 2003 ; Graham et coll., 2003).

Sox2 qui a été démontré comme jouant un rôle important dans la neurogenèse en régulant l'expression de *FGF4* (Fibroblast Growth Factor 4) et de la nestine, est également nécessaire à la prolifération et au maintien du stock de cellules souches neurales (Osumi et coll., 2008 ; Yuan et coll., 1995). *Sox2* interagit aussi avec le gène *Pax6* à la fin du développement embryonnaire. En effet, Wen et coll. ont montré dans un modèle déficient pour *Pax6* qu'à E18,5 du développement, *Pax6* régule la prolifération des progéniteurs neuraux de la zone sous-ventriculaire en modulant directement l'expression de *Sox2* (Wen et coll., 2008).

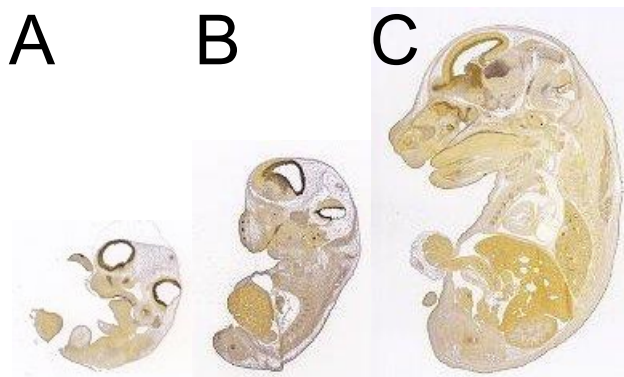


Figure 14: Hybridation *in situ* des ARNm codants pour *Sox2* à différents stades de développement embryonnaire chez la souris : E11,5 (A), E13,5 (B) et E15,5 (C) (Allen Brain atlas: <http://www.brain-map.org/>)

4.3. Pax6

Pax6 (Paired box 6) appartient à une famille de facteur de transcription qui joue un rôle déterminant dans le destin neuronal et la prolifération des cellules souches. Il participe au positionnement du néocortex et à la production des neurones des couches superficielles par l'identification des progéniteurs de la zone sous-ventriculaire (Zhang et Jiao, 2015). *Pax6* est utilisé pour identifier les cellules de la glie radiaire (Englund et coll., 2005).

À partir du jour 8 de la gestation chez la souris, Pax-6 est exprimé dans les régions du cerveau antérieur et du cerveau postérieur. A 8,5 jours de développement, Pax6 est retrouvé dans le tube neural. Son expression est principalement confinée aux cellules mitotiques actives dans la zone ventriculaire ventrale tout le long de l'axe antéropostérieur (Walther et Gruss, 1991). A E10, Pax6 est exprimé dans le télencéphale dorsal au niveau de la zone ventriculaire mais pas dans les neurones néoformés. Son expression au cours du développement embryonnaire est illustrée dans la Figure 15. Au cours de la neurogenèse, son expression persiste dans la zone ventriculaire du télencéphale dorsal qui devient moins épaisse et dans les régions qui lient le télencéphale ventral avec le télencéphale dorsal (Osumi et coll., 2008).

Pax6 qui est impliqué dans le développement du bulbe olfactif, contrôle également celui de l'œil aussi bien avant qu'après la naissance en régulant l'expression de nombreux gènes exprimés dans les différentes structures de l'œil (Heyningen et coll., 2002).

Au niveau expérimental, la délétion de Pax6 réduit la prolifération *in vitro* des cellules souches neurales murins (Gómez-lópez et coll., 2011). *In vivo*, la mutation de Pax6 entraîne des anomalies de la neurogenèse corticale comme la perte de la face dorsale et des caractéristiques télencéphaliques ventrales (Quinn et coll., 2007). Pax6 est aussi capable d'induire l'expression du facteur pro-neural neurogenin (Ngn2) dans le cortex et la moelle épinière induisant ainsi une neurogenèse indirecte (Scardigli et coll., 2003).

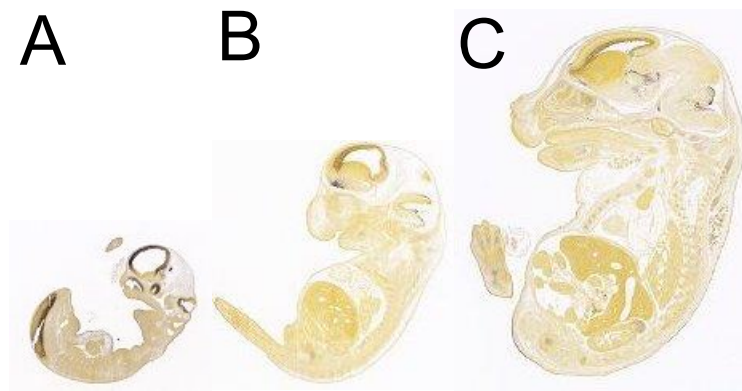


Figure 15: Hybridation *in situ* des ARNm codants pour Pax6 à différents stades de développement embryonnaire chez la souris : E11,5 (A), E13, 5 (B) et E15,5 (C) (Allen Brain atlas : <http://www.brain-map.org/>)

4.4. GLAST

GLAST (également connu sous les noms de GLUT1 (Glucose Transporter 1), EAAT1 (Excitatory Amino Acid Transporter) ou SLC1A3 (Solute Carrier Family 1 Member 3) est un transporteur de glutamate. GLAST est un marqueur des cellules de la glie radiaire et des cellules gliales (astrocytes matures) (Kugler et Schleyer, 2004) qui est impliqué dans la différenciation gliale et dont l'expression persiste à l'âge adulte (Barry et coll., 2008 ; Shibata et coll., 1997). Abondamment présent sur la membrane cellulaire des astrocytes (Chaudhry et coll., 1995), GLAST est caractérisé par une expression transcriptionnelle importante dans la zone ventriculaire. L'expression de GLAST à un stade précoce du développement au niveau des GRa suggère que ce transporteur du glutamate est impliqué non seulement dans la régulation de la transmission synaptique, mais aussi dans le développement et la différenciation du système nerveux central. Par exemple, son expression dans les cellules neuroépithéliales permet leur transition vers les cellules de la glie radiaire (Doetsch et coll., 2003; Rushing et coll., 2016). *In vitro*, GLAST est co-exprimé dans les cellules souches exprimant Sox2 (Lee et Pow, 2010 ; Plachez et coll., 2000).

En comparaison à d'autres marqueurs de la GR qui commencent à s'exprimer dès E9 (comme RC1), GLAST apparaît plus tardivement dans le développement impliquant un gradient ventro-dorsal différent. Il commence à s'exprimer à E11 et devient intense à E13 (Figure 16). Au niveau dorsal, GLAST apparaît à E13 et devient intense à E15 (Shibata et coll., 1997). De par sa localisation dans les cellules de la glie radiaire, GLAST aide à la migration des neurones nouvellement formés en modulant le niveau de glutamate. Les résultats obtenus par Shibata et coll. suggèrent que si les transporteurs GLAST au niveau des processus radiaux abaissent le niveau du glutamate, ils ralentiraient la migration neuronale et protégeraient les neurones en migration de l'activation excessive du récepteur NMDA conduisant à une excitotoxicité. Au contraire, si GLAST fournit du glutamate aux neurones en migration, il faciliterait la migration neuronale (Shibata et coll., 1997).

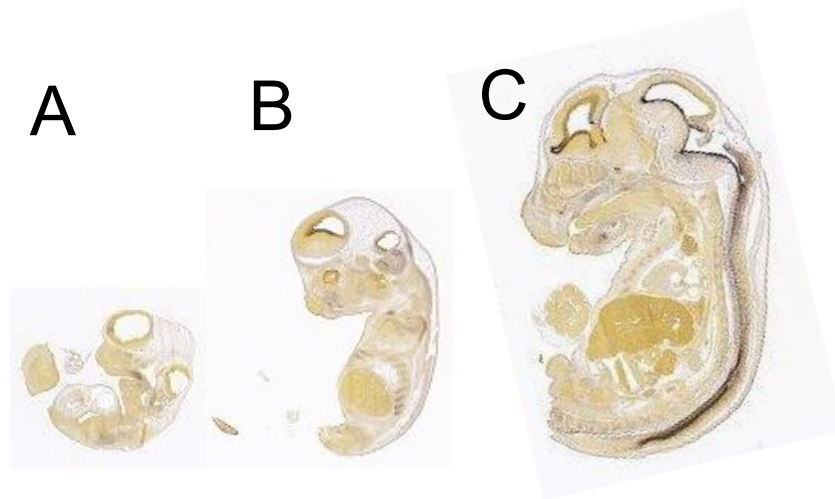


Figure 16: Hybridation *in situ* des ARNm codants pour GLAST à différents stades de développement embryonnaire chez la souris : E11,5 (A), E13, 5 (B) et E15,5 (C) (Allen Brain atlas : <http://www.brain-map.org/>)

4.5. La famille des gènes T-box

Les gènes T-box appartiennent à une super famille de facteurs de transcription qui se lient à l'ADN par une séquence spécifique appelée élément de liaison à la T-box (Mihalas et coll., 2017). Il existe 5 sous-familles : T, Tbx1, Tbx2, Tbx6 et Tbr1. La sous-famille Tbr1 est constituée de Tbr1, Tbr2 (Eomes) et Tbx21 (ou T-bet). Tbr1 et Tbr2 ont 86 % d'homologie dans leur domaine T-box, 31 % dans la région N-terminale et 40 % dans la région C-terminale. D'une manière intéressante, Tbr2 possède un domaine de transactivation dans sa région C-terminale qui est similaire à 51% avec la partie C-terminale du Tbr1, ce qui révèle une fonction d'activation transcriptionnelle conservée entre Tbr1 et Tbr2. Au cours du développement du cortex cérébral, Tbr2 et Tbr1 sont exprimés au cours des étapes successives de la différenciation dans la lignée des neurones pyramidaux, des progéniteurs intermédiaires Tbr2⁺ aux neurones glutamatergiques post-mitotiques Tbr1⁺ (Mihalas et coll., 2017).

4.5.1. Tbr2

Tbr2 est exprimé dans les régions prolifératives du cortex cérébral, le bulbe olfactif et le cervelet (Bulfone et coll., 1999). Son expression est utilisée pour définir les limites de la zone sous-ventriculaire dans les cortex en développement (Mihalas et coll., 2017). Les cellules Tbr2⁺ se divisent dans la zone sous-ventriculaire, au niveau basal de la zone ventriculaire et rarement dans la zone intermédiaire (Smart et coll., 1973). Tbr2 est un régulateur principal de la neurogenèse embryonnaire qui favorise la génération et la prolifération de progéniteurs intermédiaires dans la ZSV pour donner

naissance à des neurones glutamatergiques pyramidaux dans le cortex cérébral en développement (Englund et coll., 2005).

Tbr2 est exprimé dans le cerveau de la souris à partir du jour embryonnaire E10,5 (Figure 17) durant tout le cycle de vie des progéniteurs intermédiaires. Son expression qui est plus forte pendant leur phase S et leur phase M dans les PI est par ailleurs absente de la majorité des GR exprimant Pax6 (Englund et coll., 2005).

L'inactivation de Tbr2 qui réduit le nombre de progéniteurs intermédiaires et aboutit à une perte importante de neurones excitateurs dans le cortex cérébral met en évidence son importance au niveau des PI (Mihalas et coll., 2017). Cela est en accord avec les microcéphalies retrouvées chez les patients porteurs d'une délétion du gène Tbr2 (Baala et coll., 2007). De plus, l'inactivation de Tbr2 dans un modèle de souris déficiente pour Tbr2 induit une létalité embryonnaire ayant lieu avant la formation du cortex (Russ et coll., 2000). Au contraire, l'électroporation de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire comme Cdk4 et la cycline D1, induit une augmentation du nombre des progéniteurs intermédiaires Tbr2 positif se traduisant par une augmentation significative de la surface corticale, par la formation de plis et de fissures supplémentaires chez les ferrets, tout en préservant un cortex à six couches structurellement normal (Nonaka-Kinoshita et coll., 2013)

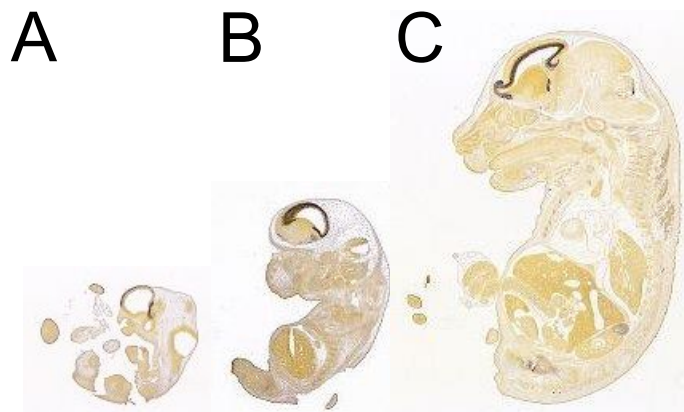


Figure 17: Hybridation *in situ* des ARNm codants pour Tbr2 à différents stades de développement embryonnaire chez la souris : E11,5 (A), E13,5 (B) et E15,5 (C) (Allen Brain atlas : <http://www.brain-map.org/>)

4.5.2 Tbr1

C'est en 1992 que Porteus et coll. ont découvert Tbr1 à partir d'un screening effectué sur la librairie cDNA du cerveau antérieur embryonnaire (Porteus et coll., 1992). Bulfone et coll. ont par la suite décrit l'expression spécifique de Tbr1 dans le cortex cérébral au début de la neurogenèse à E10,5

(Figure 18) ; surtout au niveau des neurones post-mitotiques mais également et dans la plaque corticale, le bulbe olfactif et le cervelet (Bulfone et coll., 1995). Son expression est corrélée avec la différenciation des progéniteurs corticaux et la migration neuronale (Bulfone et coll., 1995 ; Han et coll., 2011). L'expression de Tbr1 est montrée comme exclusive dans les neurones glutamergiques. Aucun autre type de neurones ne l'exprime, au même titre que les cellules souches neurales ou les cellules gliales (GR ou astrocytes) (Mihalas et coll., 2017, Hevner et coll., 2006). Son expression diminue après la naissance. Expérimentalement, les souris déficientes pour Tbr1 présentent des altérations dans la lamination corticale, dans les connections axonales et dans la différenciation spécifique de chaque couche corticale (Hevner et coll., 2001).

Il faut également noter que l'expression simultanée de Tbr1 et Tbr2 dans les mêmes cellules est rare, même si des cellules qui expriment ces deux facteurs de transcription ont pu être observées à l'interface ZSV-ZI. Ces données suggèrent que la perte d'expression de Tbr1 qui est concomitante à l'expression de Tbr2 conduit à la transition rapide des progéniteurs intermédiaires en neurones (Nelson et coll., 2013). Tbr1 a par ailleurs été montré comme impliqué dans un réseau de régulateurs intrinsèques qui joue un rôle central dans le contrôle temporel et dans la spécification du destin cortical dans le cortex en développement. Par exemple, Tbr1 est capable de réprimer Ctip2 (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2) un facteur qui favorise la génération précoce des neurones de la couche VI (Martynoga et coll., 2012 ; McKenna et coll., 2011).

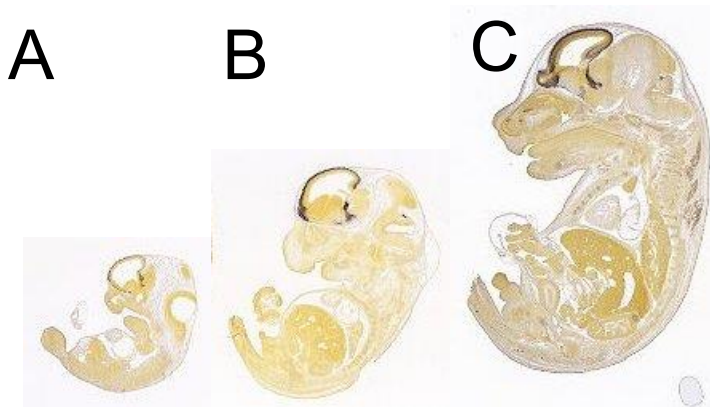


Figure 18: Hybridation *in situ* des ARNm codants pour Tbr1 à différents stades de développement embryonnaire chez la souris : E11,5 (A), E13, 5 (B) et E15,5 (C) (Allen Brain atlas : <http://www.brain-map.org/>)

5. Les facteurs qui influencent le destin des progéniteurs neuraux

L'équilibre entre les progéniteurs et les neurones se fait à partir de trois types de divisions apicales et basales : la division symétrique proliférative, la division asymétrique auto-renouvelable ou génératrice de neurones, et la division neurogénique basale (Farkas et Huttner, 2008). De nombreux facteurs contrôlent cet équilibre contribuant ainsi à la régulation de la prolifération de la glie radiaire apicale, du passage vers une identité de progéniteurs basaux et de la production neuronale. Plusieurs mécanismes ou facteurs auront la possibilité d'influencer le destin des progéniteurs neuraux : le plan de clivage et l'héritage des processus apicaux et basaux, le cycle cellulaire, la migration nucléaire intercinétique et les voies de signalisation.

5.1. Le plan de clivage et l'héritage des processus apicaux et basaux

L'orientation du plan de clivage jouerait un rôle dans la détermination du mode de division et du destin cellulaire. En effet, il a été montré que les progéniteurs apicaux (comprenant les NE et les GRa) des mammifères subissent des divisions prolifératives symétriques qui se produisent quand le plan de clivage (ou axe de division) est perpendiculaire (ou vertical ou radial) à la surface apicale (ventricule), produisant ainsi des cellules identiques (Figure 19). Dans ce type de division, les cellules filles hériteraient à part égale des constituants apicaux et basaux. En revanche, si le plan de clivage est parallèle au ventricule (ou horizontal), une division asymétrique prend place pour produire deux types de cellules différentes qui hériteraient pour chacune d'entre elles des constituants apicaux ou des constituants basaux (Figure 19) (Chenn et McConnell, 1995). Ainsi, au début du développement embryonnaire, la division verticale serait majoritairement présente afin d'augmenter le stock de précurseurs neuraux, tandis qu'à l'âge adulte, la scission horizontale serait prédominante (Hirabayashi et Gotoh, 2005).

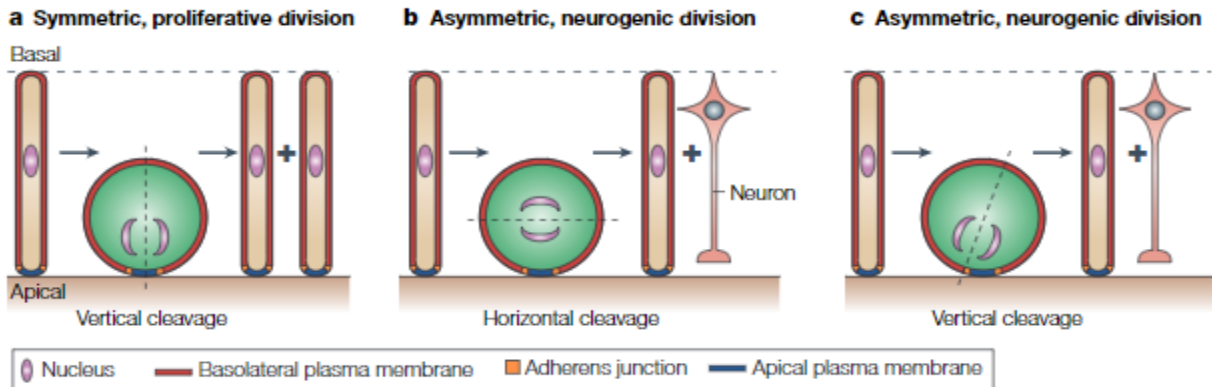


Figure 19: Illustrations de la division asymétrique versus division symétrique et des plans de clivage des cellules neuroépithéliales et des cellules de la glie radiaire. a) un plan de clivage vertical induit une division symétrique proliférative b) un plan de clivage horizontal induit une division asymétrique neurogénique c) un plan de clivage oblique induit une division neurogénique asymétrique (Götz et Huttner, 2005).

Ce modèle qui repose sur le plan de clivage n'est cependant pas complètement confirmé par d'autres équipes (Noctor et coll., 2008). En effet, Konno et coll en 2008 ont montré dans un modèle de souris déficiente pour une protéine responsable de l'orientation du fuseau mitotique (LGN) que le contrôle de l'orientation du fuseau est essentiel pour le maintien de la population de NE, mais pas indispensable pour la décision de proliférer ou de se différencier (Konno et coll., 2008). Leurs résultats suggèrent qu'une mitose verticale assure l'autorenouvellement des NE par l'héritage des processus radiaux apicaux et basaux comme déjà évoqué plus haut.

Les NE et les GRa possèdent des processus (ou domaines) apicaux qui présentent des jonctions adhérentes réparties au niveau de la membrane apicale (Figure 20). Ces jonctions adhérentes localisent les déterminants du destin cellulaire et régulent leur héritage (Marthiens et French Constant, 2009). On considère que si les GRa perdent ce domaine apical, elles seront restreintes à la division neuronale alors que si les GRa héritent du domaine apical, elles pourront se maintenir dans un état prolifératif qui maintiendra l'autorenouvellement de la glie radiaire apicale (Fietz et coll., 2010 ; Konno et coll., 2008 ; Tsunekawa et coll., 2012).

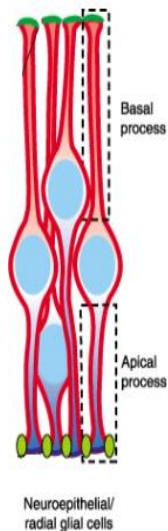


Figure 20: Représentation schématique des processus apicaux et basaux des cellules neuroépithéliales et des cellules de la glie radiaire. Les structures vertes au niveau apical représentent les jonctions adhérentes (adapté de Kosodo et Huttner 2009).

Les cellules NE et de la GRa ont également un processus ou extension basal qui joue un rôle dans l'échafaudage nécessaire à la migration des neurones néoformés, dans la transduction du signal et dans l'implication de la structure cellulaire pour l'orientation du plan de clivage. L'héritage de ces processus basaux contribue aussi à la détermination du destin cellulaire de la glie radiaire apicale. Ainsi, le signal du processus basal qui dépend de l'intégrine, est nécessaire au maintien du potentiel prolifératif de la GRa et GRb (Fietz et coll., 2010). Il a également été démontré que la cellule qui hérite du processus basal progresse dans la phase G1 en retenant son potentiel prolifératif (Fietz et coll., 2010 ; Konno et coll., 2008 ; Tsunekawa et coll., 2012).

En conclusion, il est bien établi que l'héritage et le maintien des caractéristiques épithéliales qui impliquent les processus apicaux et basaux, ainsi que l'orientation du fuseau mitotique jouent un rôle important dans la détermination du destin cellulaire pendant la division de la glie radiaire apicale (Matsuzaki et Shitamukai, 2015).

5.2. Le cycle cellulaire

Au cours du développement, la durée du cycle cellulaire augmente progressivement tout en s'accompagnant d'une transition du mode de division symétrique (mode prolifératif) vers le mode de division asymétrique (mode neurogénique) (Takahashi et coll. 1995). Au début de la neurogenèse, quand le tube neural est en formation, la durée du cycle cellulaire est de huit heures (Hoshino et coll. 1973). Ensuite, cette durée augmente pour atteindre onze heures à E11 (Atlas et Bond 1965), quinze

heures à E13 (Hoshino et coll. 1973), puis dix-neuf heures à E19 (von Waechter et Jaensch 1972). Cet allongement du cycle cellulaire est principalement dû à l'augmentation de la durée de la phase G1. En effet, une étude menée par Calegari et Hunter en 2003 sur des embryons de souris montre que l'inhibition des cyclines spécifiques de la phase G1 provoque une augmentation de la durée du cycle cellulaire qui conduit à une neurogenèse précoce (Calegari et Huttner 2003). Au contraire, la surexpression de CDK4 et de la cycline D1, diminue la durée du cycle cellulaire et par conséquent augmente la vitesse de prolifération ainsi que le pool des progéniteurs (Pilaz et coll., 2009, Nonaka-Kinoshita et coll., 2013).

La corrélation entre l'allongement du cycle cellulaire et la différenciation a été rapportée dans plusieurs lignées de cellules souches différentes (embryonnaires, neurales ou hématopoïétiques ; Lange et Calegari, 2010). Par exemple, il a été montré que les GRa ont un cycle cellulaire plus court que celui des progéniteurs neurogéniques (Calegari et coll., 2005 ; Arai et coll., 2011). L'allongement de la phase G1 indique que les progéniteurs basaux se délaminent de la jonction apicale et déplacent leurs noyaux en direction basale (typiquement à la ZSV) de façon plus importante que les progéniteurs apicaux en G1, et rétractent leurs processus apicaux et basaux (Attardo et coll., 2008 ; Miyata et coll., 2004 ; Noctor et coll., 2004).

Même si l'influence de la phase G1 sur la longueur du cycle cellulaire a été la plus étudiée, des études ont également montré que les phases G2 et S pouvaient influencer la durée du cycle cellulaire. En effet, les progéniteurs neuronaux qui se divisent dans la partie basale de la zone ventriculaire et dans la zone sous-ventriculaire ont une phase G2 plus longue que celle des progéniteurs neuronaux qui se divisent à la surface ventriculaire apicale (Calegari et coll., 2005). Ces résultats confirment l'hypothèse établie Calegari et Huttner en 2003 qui proposait que l'allongement du cycle cellulaire des progéniteurs neuronaux favorise le passage de la division proliférative vers la division neurogénique (Calegari et Huttner, 2003).

Enfin, la durée de la phase S au même titre que celle des phases G1 et G2 représente un facteur important dans le maintien de la capacité proliférative des progéniteurs neuronaux. Il est décrit que la phase S est plus longue dans les progéniteurs apicaux et basaux en expansion que dans les progéniteurs apicaux et basaux neurogéniques (Arai et coll., 2011) et que la phase S est plus courte dans les progéniteurs qui donneront des neurones à la prochaine division (Attardo et coll., 2008).

5.3 Migration nucléaire intercinétique

Au sein du neuro-épithélium, les cellules NE et GRa ont une polarité apico-basale. Les noyaux des cellules souches en prolifération présents dans la zone ventriculaire effectuent des déplacements entre les surfaces apicale et basale en fonction du cycle cellulaire. Cette migration nucléaire appelée migration intercinétique est observée dans les cellules neuroépithéliales, les cellules de la glie radiaire et à un niveau moindre dans les progéniteurs basaux (Miyata et coll., 2015) (Figure 25). Dans les cellules NE, les noyaux qui se trouvent à la surface apicale du neuroépithélium se déplacent vers le côté basal pendant la phase G1 du cycle cellulaire. Après avoir terminé leur phase S dans la partie basale, les noyaux retournent à la surface apicale pendant la phase G2 pour entrer en mitose au bord du ventricule (Miyata et coll., 2015).

Le même processus de migration intercinétique est observé dans les cellules de la glie radiaire, mais elle est cependant restreinte à la zone ventriculaire (Figure 21). Enfin, le noyau des progéniteurs basaux quitte la surface apicale des zones ventriculaires pour entreprendre ses phases S, G2 et M. En effet, contrairement aux noyaux des NE et des GRa, ceux des progéniteurs basaux restent en région basale de la surface ventriculaire, voire en région sous-ventriculaire pour effectuer leurs mitoses (Figure 21, Gotz et Huttner 2005). Après la phase S, le noyau des progéniteurs basaux garde la possibilité de migrer à nouveau vers le ventricule apical (tout comme celui des NE et de la glie radiaire) puis de changer de direction pour revenir au niveau basal pour effectuer sa mitose dans la ZV ou la ZSV (Götz et Huttner, 2005).

Plusieurs équipes ont cherché à mieux comprendre la signalisation du couplage entre la position nucléaire par rapport à l'axe apical-basal de la cellule et la phase du cycle cellulaire, ainsi que les conséquences d'un découplage possible entre migration nucléaire intercinétique et cycle cellulaire pour la neurogenèse (Miyata et coll., 2005). Ainsi, le facteur de transcription Pax6 est décrit comme nécessaire à ce couplage. En 2002, il a été montré qu'au début de la corticogénèse embryonnaire à E12,5, l'absence de Pax6 induit une accélération du développement cortical *in vivo* qui est associé à un raccourcissement du cycle cellulaire et du temps nécessaire pour l'expression des marqueurs neuronaux. Entre E12,5 et E15,5 du développement, la proportion de divisions asymétriques augmente plus rapidement dans les embryons mutants que dans les embryons sauvages. Enfin, à E15,5, la migration nucléaire intercinétique dans le cortex de souris déficientes pour Pax6 est perturbée, en

accord avec l'augmentation de la longueur du cycle cellulaire principalement due à un allongement de la phase S (Estivill-Torrus, 2002). Ces données obtenues *in vivo* ont été confirmées *in vitro* dans des cultures de cellules isolées ce qui suggère que les changements observés sont intrinsèques aux cellules corticales. Ces résultats montrent également l'importance de Pax6 dans le contrôle de la durée du cycle cellulaire, la migration intercinétique ainsi que dans la progression de la division symétrique vers la division asymétrique (Estivill-Torrus, 2002).

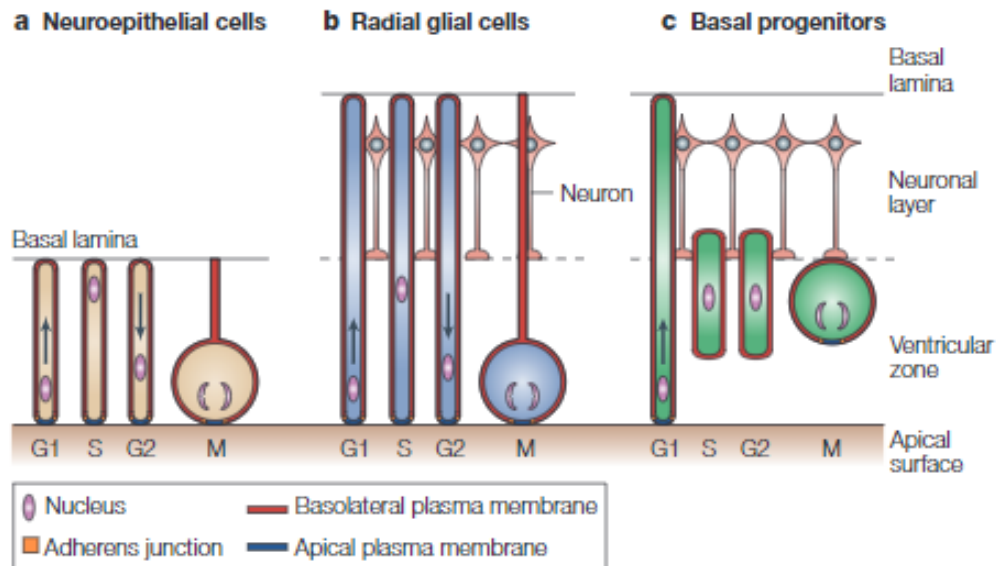


Figure 21: Polarité des cellules et migration intercinétique nucléaire. a, Dans les cellules neuroépithéliales, la migration nucléaire intercinétique recouvre tout l'axe apical-basal de la cellule. Le noyau migre vers le côté basal pendant la phase G1 pour rester localisé du côté basal durant la phase S, puis migre vers le côté apical pendant la phase G2, pour finalement effectuer une mitose à la surface apicale. b, Dans les cellules gliales radiales, la migration nucléaire intercinétique dirigée à la base ne s'étend pas jusqu'au côté basal (c'est-à-dire à travers la couche neuronale jusqu'aux extrémités piales). Cette migration est confinée dans la partie de la cellule située entre la surface apicale et la limite basale de la zone ventriculaire. c, Dans les progéniteurs basaux, le noyau en G1 migre de la surface apicale à la limite basale de la zone ventriculaire (ligne pointillée) pour rester à cette localisation durant les phases S et G2 concomitante à la rétraction des processus apicaux avant d'effectuer une mitose en localisation basale (Gotz et Huttner 2005).

5.4. Les voies de signalisation

La prolifération et la différenciation des cellules souches neurales impliquent la coordination et l'intégration de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Parmi celles-ci, je décrirais trois d'entre elles : la voie Wnt/ β -caténine, la voie Notch et la voie BMP/Smad.

La voie de signalisation canonique Wnt/ β -caténine joue un rôle crucial à la fois dans le développement du système nerveux central et dans la neurogenèse. Chez les mammifères, de nombreux gènes de la voie Wnt sont exprimés pendant le développement du cortex d'une manière spatio-temporelle (Fougerousse et coll., 2000 ; Lee et coll., 2000). Durant le développement embryonnaire la voie Wnt/ β -caténine contrôle la prolifération et détermine le destin des cellules souches neurales. Par exemple, *in vitro*, la surexpression du récepteur Wnt7a ou de la forme stabilisée de la β -caténine induit la différenciation des progéniteurs corticaux primaires neuraux de souris à E11,5 ; même en présence du facteur FGF2 (facteur connu pour induire l'autorenouvellement des progéniteurs). Au contraire, le blocage du signal Wnt inhibe la différenciation neuronale des cellules *in vitro* et dans le néocortex murin en développement (Hirabayashi et coll., 2004). Les mêmes auteurs ont au contraire montré qu'à des stades de développement plus précoces, la stabilisation de la β -caténine n'induit pas la différenciation des progéniteurs neuraux corticaux (Hirabayashi et coll., 2004). Ces résultats sont en accord avec une autre étude qui montre que la stabilisation de la β -caténine dans les précurseurs neuro-épithéliaux *in vivo* conduit à l'expansion du cortex chez la souris à E15,5 ; augmentant ainsi la surface corticale. Cette expansion s'explique par une ré-entrée des précurseurs dans le cycle cellulaire, après la mitose. Malgré l'expansion de la surface corticale, les précurseurs des souris transgéniques n'arrêtent pas de se différencier et de produire des neurones post-mitotiques (Chenn et Walsh, 2002). La voie Wnt joue aussi un rôle central dans la structuration antéropostérieure du mésencéphale au cours de la neurogenèse. L'utilisation de l'inhibiteur GSK3 connu pour activer la voie Wnt montre que l'activation de cette voie induit l'expression du marqueur spécifique du mésencéphale EN1 (Engrailed 1) dans des cellules souches pluripotentes dérivées des précurseurs neuronaux humains (Kim et coll., 2018). Ces données suggèrent que la voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans la spécification et la différenciation au niveau du mésencéphale (Kim et coll., 2018). Dans une autre étude, il a été rapporté que la prolifération des progéniteurs neuraux diminuée en hypoxie (<1% oxygène) peut être restaurée en activant la voie Wnt/ β -caténine en modulant le niveau de HIF-1 α (Mazumdar et coll., 2010 ; Volman et coll., 2011). De la même manière, l'activation *in vitro* de la voie Wnt/ β -caténine par l'hypoxie (3%) est capable de restaurer la prolifération et la différenciation neuronale des cellules de la glie radiaire humaines (14-24 semaines de gestation) qui étaient diminuées en hypoxie (Ortega et coll., 2017).

De nombreuses études montrent également que la voie Notch est un régulateur important pour les cellules souches neurales, jouant par conséquent un rôle clé dans le développement du système nerveux aussi bien dans le maintien des cellules souches neurales que dans la différenciation neuronale pendant le développement du cerveau (Hitoshi et coll., 2002 ; Imayoshi et coll., 2010 ; Jiao et coll.,

2017 ; Kageyama et coll., 2008 ; Ross et coll., 2003 ; Yoon et Gaiano, 2005). Il a été montré, que la délétion d'une protéine intracellulaire qui module l'expression de Notch (Rbpj) à E9,5 induit une diminution de la taille du cerveau, une augmentation des neurones post-mitotiques, une réduction des cellules de la glie radiaire en division (Brdu⁺), une réduction des marqueurs de la glie radiaire GLAST et Nestine et une perte de la zone ventriculaire. Ceci suggère que le maintien des cellules souches neurales du cerveau embryonnaire dépend de la voie Notch (Imayoshi et coll, 2010). La génération de souris déficiente pour Notch vient confirmer ces données. En effet, chez ces souris (Notch^{-/-} ou **RBP-Jκ^{-/-}**), une perte totale des cellules souches neurales dans le cerveau embryonnaire est observée au stade E10,5 de développement (Hitoshi et coll., 2002). Au contraire, la différenciation neuronale et gliale induite *in vitro* par l'atténuation de la signalisation de Notch est supprimée par la transduction d'une forme active constitutive de Notch dans ces cellules (Hitoshi et coll., 2002). Enfin plus récemment, il a été rapporté dans des cultures de cellules souches neurales provenant d'embryon de rat de 13,5 jours que son inhibition *in vitro* par miR-124 induisait la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales (Jiao et coll., 2017). Ces quelques exemples mettent en évidence que la modulation de la voie Notch, au même titre que celle de la voie Wnt, joue un rôle clé dans le destin des progéniteurs neuraux.

Enfin, l'influence des BMP (Bone Morphogenetic Protein) représente également une voie de signalisation importante dans la régulation et le contrôle des cellules souches neurales. Alors qu'ils sont produits tôt au niveau du télencéphale (Hébert et coll., 2002), leur perte totale à E11,5 inhibe le développement des structures medio-dorsales résultant en l'absence d'hippocampe (Fernandes et coll., 2007). En fonction du type de récepteur de BMP étudié, les effets qu'ils exercent sur les précurseurs neuraux sont très divers et s'expliquent par les activités spécifiques associées à un type de récepteur. Par exemple, les récepteurs BMP de type Ia sont décrits comme favorisant la prolifération dans le télencéphale embryonnaire alors que les récepteurs de type Ib induisent un arrêt du cycle cellulaire et une différenciation (Panchision et coll., 2001). *In vitro*, le récepteur au BMP4 a été montré comme important à la fois dans la maintenance de l'autorenouvellement et dans l'inhibition de la différenciation neuronale des cellules souches embryonnaires de souris (Zhang et coll., 2013) alors qu'il est impliqué dans la spécification dorsale des cellules de la plaque neurale au niveau de l'ectoderme (Liem et coll., 1995).

5.5. L'effet des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales interagissent avec les cellules neuroépithéliales du cerveau par des facteurs solubles sécrétés (interactions à longue portée) ou par un contact physique direct (interactions à courte portée) avec des effets biologiques potentiellement différents (Sosa et coll., 2007). Afin d'étudier l'effet des cellules endothéliales sur le comportement des progéniteurs neuraux, de nombreuses études *in vitro* ont été effectuées sur des progéniteurs neuraux embryonnaires mis en co-culture avec les cellules endothéliales (contact indirecte) ou en contact directe avec les cellules endothéliales (Dong et coll., 2007 ; Shen et coll., 2004, Sosa et coll., 2007). Ces études ont mis en évidence que les facteurs solubles sécrétés par les cellules endothéliales favorisent l'autorenouvellement des progéniteurs neuraux et inhibent leur différenciation. Au contraire, les contacts directs des progéniteurs neuraux avec les cellules endothéliales entraînent leur différenciation neuronale (Shen et coll., 2004, Sosa et coll., 2007). Ces études ont été effectuées sur des progéniteurs neuraux de E10-E11 (Shen et coll., 2004) et de E13,5-E14,5 (Sosa et coll., 2007).

6. Neurogenèse et HIF-1 α

6.1. L'effet de l'hypoxie sur les cellules souches neurales

L'oxygène qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme oxydatif est notamment important dans les voies qui contrôlent la prolifération cellulaire, le devenir et la survie cellulaire, ainsi que la morphogenèse des tissus et des organes. Puisque même des changements mineurs dans la tension de l'oxygène peuvent avoir un impact sur la physiologie cellulaire et la survie, les organismes aérobiques doivent maintenir leurs tissus dans un état d'équilibre dynamique, appelé homéostasie de l'oxygène (De Filippis et Delia, 2011). Il a été établi que l'hypoxie régule la prolifération et la différenciation de différentes populations de cellules souches, y compris les cellules souches embryonnaires et les cellules souches neurales (Lange et coll., 2016 ; Singh et coll., 2012) ainsi que les blastocytes aux stades précoces du développement embryonnaire (Jauniaux et coll., 1999). Plusieurs études ont également révélé que l'hypoxie pourrait profondément influencer le microenvironnement des cellules souches et favoriser la différenciation de certains types de cellules souches ou progénitrices, tout en inhibant la différenciation d'autres types cellulaires (Simon et Keith, 2008). Ainsi, l'hypoxie est considérée comme

jouant un rôle important dans la régulation de la différenciation neuronale des cellules souches/progéniteurs. Dans le cerveau embryonnaire et adulte, les progéniteurs neuraux résident dans des niches hypoxiques (Lee et coll., 2001 ; Zhu et coll., 2005) où la tension d'oxygène régule la balance entre le maintien des cellules souches neurales et la différenciation des progéniteurs neuraux (Chen et coll., 1999 ; Mohyeldin et coll., 2010 ; Simon et Keith, 2008). Ces progéniteurs sont capables de répondre aux changements de tension d'oxygène par de nombreux signaux intrinsèques, conduisant à un changement de leur destin et/ou de leur capacité proliférative.

Pendant l'étape précoce de la neurogenèse (E5,5 à E8,5), l'hypoxie ne semble pas jouer un rôle régulateur important. Pendant cette étape, les cellules souches neurales primitives se forment et peuvent être isolées de l'embryon antérieur à partir de E5,5 et du neuroectoderme à partir de E8,5 (Abramihina et coll., 2012 ; Ezashi et coll., 2005). Sur ces cellules, il a pu être montré que la génération de cellules issues du neuroectoderme était facilitée en condition de normoxie en comparaison à des conditions de culture hypoxiques (Abramihina et coll., 2012). En revanche, durant l'étape tardive de la neurogenèse qui se situe après le stade de développement de 8,5 jours, l'hypoxie active de nombreuses voies de signalisation (Wnt/ β -caténine/Notch etc..) et exerce son effet sur la différenciation neurale des cellules souches ce qui conduit à la formation des progéniteurs neuraux (De Filippis et Delia, 2011). Pendant cette étape, les cellules souches neurales primitives se transforment en cellules souches neurales définitives qui persistent dans le cerveau toute la vie (Hitoshi et coll., 2004). Le rôle de l'hypoxie dans ces étapes d'induction neurale a été confirmé *in vitro*. Ainsi, une hypoxie modérée (5 %) est capable d'induire la différenciation neurale des cellules souches embryonnaires pendant l'étape de formation des progéniteurs neuraux à partir des cellules souches neurales, mais pas pendant la formation des cellules souches neurales à partir des cellules souches embryonnaires murines (Binh et coll., 2014 ; Ezashi et coll., 2005 ; Gustafsson et coll., 2005).

L'hypoxie ou l'hyperoxie ont donc des conséquences sur le développement du cerveau embryonnaire. Ainsi, Wagenführ et coll. ont mis en évidence que le volume du cerveau embryonnaire variait selon que la mère se trouve dans un environnement hypoxique ou hyperoxique. En condition hyperoxique, le volume des cerveaux embryonnaires à E16 augmente par rapport à celui des cerveaux en condition normoxie, tandis que le volume des cerveaux embryonnaires en condition hypoxique est réduit (Wagenführ et coll., 2016, 2015). Il est important de noter que ces variations de volume des cerveaux embryonnaires ne sont pas associées à un changement de l'épaisseur des zones ZV et ZSV (Wagenführ et coll., 2015).

Au vue des données disponibles dans la littérature, le consensus qui prédomine actuellement concernant l'impact du niveau d'oxygène sur les cellules souches neurales et les progéniteurs est qu'*in vitro* la normoxie (20%) induit un arrêt mitotique et une différenciation des cellules souches neurales, alors qu'une hypoxie modérée (3-5 %) augmente leur prolifération, inhibe leur mort par apoptose tout en inhibant leur différenciation neuronale (Abramihina et coll., 2012, De filippis et Delia., 2011, Gustafsson et coll., 2005, Ezashi et coll., 2005; Pistollato et coll., 2007; Santilli et coll., 2010; Studer et coll., 2000, Panchision et coll., 2009 ; Gustafsson et coll., 2005). Des résultats similaires obtenus dans des cultures de cellules souches de la crête neurale ont également été rapportés (Morrison et coll., 2000).

De manière intéressante, il a été montré que l'hypoxie à un niveau physiologique bien qu'indispensable à l'autorenouvellement des cellules souches neurales (Mohyeldin et coll., 2010 ; Pistollato et coll., 2007 ; Santilli et coll., 2010 ; Studer et coll., 2000, Ortega et coll., 2017), peut se révéler délétère quand les niveaux d'oxygène sont extrêmement faibles (< à 1 %). Dans ces conditions extrêmes d'hypoxie, les cellules souches neurales peuvent rentrer en apoptose (Ezashi et coll., 2005 ; Filippis et Delia, 2011 ; Pistollato et coll., 2007 ; Santilli et coll., 2010). Alternativement, une étude récente utilisant des progéniteurs corticaux humains a mis en évidence qu'une hypoxie sévère (1 % O₂) provoque d'une part une inhibition de la gliogénèse en diminuant le nombre de pré-oligodendrocytes et d'autre part un arrêt de la différenciation des cellules de la glie radiaire, en altérant notamment la génération des neurones glutaminergiques (Ortega et coll., 2017). Outre le rôle incontestable de l'hypoxie sur le maintien du caractère souche neurale, il est également décrit qu'une hypoxie modérée (entre 2,5 et 5 % d'O₂) peut promouvoir la différenciation des cellules souches en progéniteurs oligodendrocytaires et neuronaux (Santilli et coll., 2010). Dans ces mêmes conditions modérées d'oxygène, il a également été montré que la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones dopaminergiques est significativement augmentée. Ainsi, le pourcentage des neurones dopaminergiques atteint 56 % en hypoxie, alors qu'il est de 18 % en normoxie (20 % d'O₂) (Storch et coll., 2001, Studer et coll., 2000).

En normoxie, l'induction de l'apoptose et de la différenciation dépend des espèces et du type cellulaire étudié (Panchision et coll., 2009). Par exemple, l'atmosphère ambiant (20 % d'O₂) induit la différenciation des progéniteurs corticaux des rats (Gustafsson et coll., 2005), l'apoptose des cellules souches neurales et des progéniteurs oligodendrocytaires fœtaux murins (Chen et coll., 2007), et la

différenciation terminale des cellules souches humaines neurales et des progéniteurs oligodendrocytaires postnataux humains (Pistollato et coll., 2007). Ces variations de réponses sont certainement liées à l'implication de voies moléculaires différentes qui peuvent par ailleurs être spécifiquement régulées selon le type cellulaire ou l'espèce (Chen et coll, 2007 ; Pistollato et coll., 2007). Quoi qu'il en soit, ces études renforcent l'idée que de multiples voies de signalisation contribuent à la détermination du destin cellulaire (différenciation ou apoptose) en réponse aux niveaux d'oxygène.

6.2. Expression d'HIF-1 α

6.2.1. Au niveau du cerveau embryonnaire

L'expression d'HIF-1 α , élevée au début de la neurogenèse (E9,5) diminue au cours du développement embryonnaire (Figure 22). Au stade E9,5 de développement, HIF-1 α est exprimé à un niveau transcriptionnel élevé dans le neuroépithélium du cerveau qui persiste jusqu'à E13.5 en se localisant de manière prépondérante dans l'hypophyse primitive ainsi que dans l'épithélium neural et olfactif. HIF-1 α continue à être exprimé de manière constitutive à E15.5 puis diminue progressivement à des niveaux qui resteront relativement inférieurs par rapport à ceux observés en début de neurogenèse (Jain et coll., 1998). L'expression de HIF-1 α chez l'embryon de souris est illustrée dans la Figure 22 qui montre une expression importante dans le cortex préfrontal aux stades de développement E11,5 et E14,5 jours embryonnaires par rapport aux stades tardifs du développement.

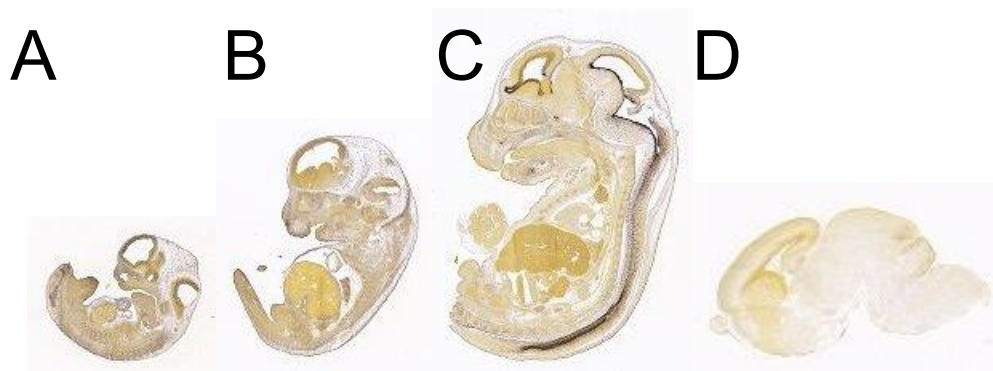


Figure 22: Hybridation *in situ* des ARNm codants pour HIF-1 α à différents stades de développement embryonnaire chez la souris : E11,5 (A), E13,5 (B), E15, 5 (C) et cerveau à E18,5 (D) (Allen Brain atlas : <http://www.brain-map.org/>)

Au niveau du neuroectoderme au stade de développement E13,5 chez les embryons de souris, HIF-1 α est retrouvé au niveau des régions hypoxiques (marquées par 2-nitroimidazole) dans les zones marginales et la zone «mantle» (pré-plaque) où sont présentes des cellules en prolifération qui ont migré de l'épendyme vers la zone marginale pour se transformer en cellules de la crête neurale et en cellules mésenchymateuses (Figure 23) (Lee et coll., 2001).

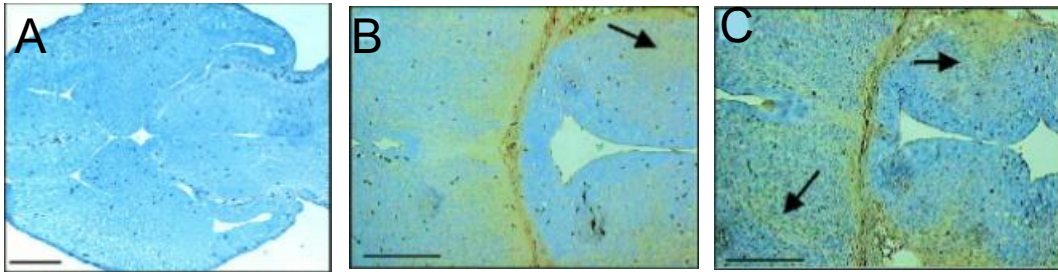


Figure 23: Expression de HIF-1 α et sa co-localisation avec l'hypoxie sur coupe coronales de cerveau embryonnaire de souris à E13,5. A. Témoin négatif ; B. Forte expression de HIF-1 α dans la couche marginale et dans la couche «mantle» (flèche). C. Colocalisation des zones hypoxiques (immunomarquage avec le pimonidazole) avec les zones exprimant HIF-1 α (adapté de Lee et coll., 2001).

6.2.2. Au niveau des cellules souches neurales

De manière étonnante, peu d'études décrivent l'expression et la localisation intracellulaire de HIF-1 α dans les cellules souches neurales. Il est cependant connu que les cellules souches embryonnaires qui dérivent de l'ectoderme et qui sont mitotiquement actives, présentent une forte expression constitutive d'HIF-1 α à E9,75-E10, suggérant ainsi l'existence d'une ou plusieurs voies spécifiques permettant l'expression d'HIF-1 α dans ces cellules. Cette expression constitutive et importante de HIF-1 α dans les cellules souches embryonnaires, qui est retrouvée aussi bien en condition non hypoxique qu'en condition hypoxique, s'est révélée nécessaire pour le maintien de l'expression de nombreux gènes indispensables aux cellules souches (ex : les gènes du métabolisme de glucose en lactate) (Iyer et coll., 1998).

La stabilisation de HIF-1 α au niveau des cellules souches et progéniteurs neurales embryonnaires à E14 et en postnatal (Roitbak et coll., 2008 ; Rotibak et coll., 2011) représente un caractère unique dans ces cellules en normoxie. Il est par ailleurs intéressant de noter que la stabilisation de HIF-1 α dans ces cellules n'est pas affectée par le changement du milieu de culture (élimination des facteurs de croissance). Roitbak et coll, ont montré que sa stabilisation dans les cellules souche neurales pouvait être liée à sa localisation dans des structures membranaires de type vésiculaire appelée HBV (HIF-1 α -Bearing Vesicles), lui permettant ainsi d'être protégé d'une

dégradation par le protéasome (Figure 24). Ce niveau protéique stable de HIF-1 α dans les cellules souches embryonnaires leur permettrait de maintenir une fraction transcriptionnelle active dépendant de HIF-1 α dans le noyau et de répondre ainsi rapidement aux stimuli externes (Roitbak et coll., 2008).

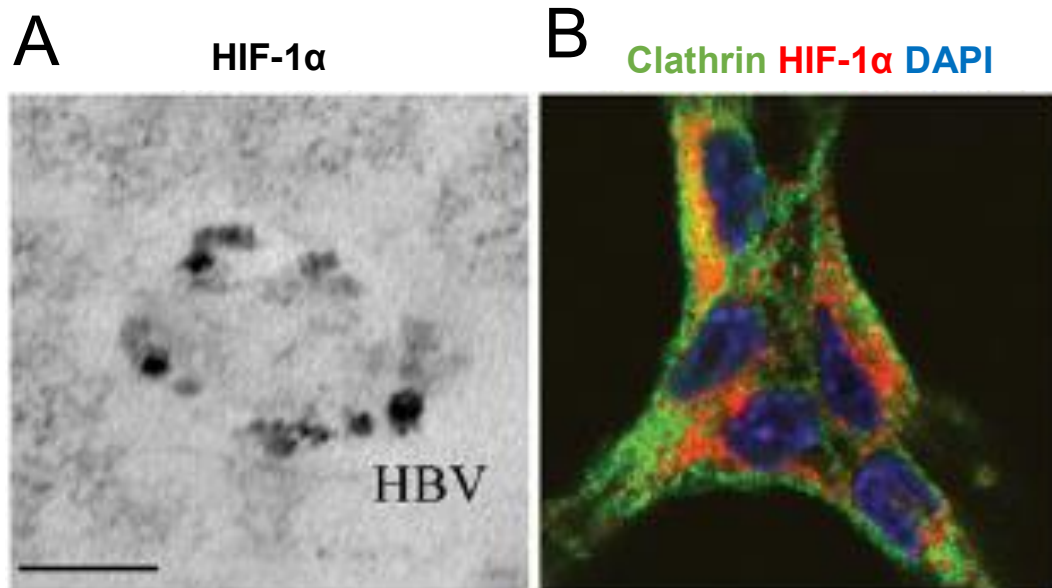


Figure 24: Mise en évidence par immunofluorescence d’une association de HIF-1 α à des structures subcellulaires HBV (HIF-1 α bearing vesicles) dans cultures de cellules souches neurales embryonnaires. A. Vésicules porteuses de HIF-1 α (HBV) associées à HIF-1 α identifiées par microscopie immuno-électronique B. Colocalisation (couleur jaune) partielle des vésicules revêtues de clathrine (vert) avec HIF-1 α (rouge) (Roitbak et coll., 2011).

6.3. Rôle de HIF-1 α dans la neurogenèse

L’étude des mécanismes impliqués dans la régulation du comportement des cellules souches neurales représente une étape importante pour la compréhension du contrôle de la neurogenèse corticale. Comme déjà décrit, les cellules souches neurales embryonnaires et adultes résident dans un environnement hypoxique qui joue un rôle majeur sur leur comportement (Lee et coll., 2001 ; Zhu et coll., 2005). Sachant que HIF-1 α est le régulateur universel de l’hypoxie, il est essentiel d’étudier son rôle sur la neurogenèse. Je présenterai donc ici les différentes études réalisées *in vitro* ou *in vivo* qui examinent l’implication d’HIF-1 α sur les cellules souches embryonnaires et adultes.

6.3.1. Au niveau des cellules souches neurales embryonnaires

De nombreuses études ont analysé l’effet de HIF-1 α sur le comportement des cellules souches embryonnaires. Ainsi, dès la fin des années 1970, Morriss et New montrent que le développement du

pli neural *in vitro* chez des embryons de rat s'effectue en conditions hypoxiques de manière HIF-1 α -dépendante, mettant en évidence un rôle de HIF-1 α dans le développement neural des embryons de rats à E9,5 (Morriss et New, 1979). Plus tard, HIF-1 α est montré comme un facteur important à l'induction de la spécification neurale des cellules souches embryonnaires (différenciation de l'épiblaste en neuroectoderme ; Zhao et coll., 2014). Toujours *in vitro*, la délétion de HIF-1 α dans les cellules souches embryonnaires à E11 altère la prolifération cellulaire 24 à 48 heures post-hypoxie (1%) (Iyer et coll., 1998). Cette altération de la prolifération qui a également été observée mais d'une manière moins significative en normoxie (20% d'O₂) s'accompagne d'une réduction de l'expression du VEGF dans les deux conditions (1% et 20% d'O₂) (Iyer et coll., 1998).

L'augmentation du niveau protéique de HIF-1 α (de 3 à 72 heures) après hypoxie (3% d'O₂ pour 3 jours) a été corrélée à l'augmentation du nombre de neurones dopaminergiques et au niveau de dopamine chez les précurseurs neuraux de rats de 13,5 jours (Zhang et coll., 2006). Des résultats similaires ont été obtenus en normoxie en augmentant artificiellement HIF-1 α par surexpression. Ces données suggèrent qu'HIF-1 α est impliqué dans la différenciation dopaminergique aussi bien en hypoxie qu'en normoxie (Zhang et coll., 2006). Dans une autre étude, une altération de la différenciation et de la fonction des progéniteurs du mésencéphale en hypoxie (3% d'O₂), ainsi qu'une diminution des neurones dopaminergiques, ont été observées dans des cellules déficientes pour HIF-1 α (Milosevic et coll., 2007). Puisque cet effet n'a pas été observé dans les progéniteurs corticaux, les auteurs en concluent qu'HIF-1 α est impliqué dans le contrôle des cellules souches neurales du mésencéphale (Milosevic et coll., 2007). Dans cette même étude, l'administration *in vitro* du VEGF (gène cible d'HIF-1 α) qui restitue partiellement la prolifération et la différenciation dopaminergique associée à la déficience de HIF-1 α , dévoile que d'autres voies indépendantes d'HIF-1 α agissent avec le VEGF (Milosevic et coll., 2007). Une induction de la prolifération (observée par l'incorporation de BrdU, Bromodeoxyuridine) et de la formation de neurosphères de cellules de rats à E13,5 en hypoxie (10% d'O₂ pendant 3 jours) a été observée suite à l'augmentation du niveau transcriptionnel d'HIF-1 α . Les mêmes effets ont été observés suite à la surexpression de HIF-1 α en normoxie (20% d'O₂) (Zhao et coll., 2008). Ces résultats suggèrent donc qu'HIF-1 α influence le devenir des cellules souches embryonnaires.

En complément de ces approches *in vitro*, plusieurs études se sont intéressées à étudier l'impact de la déficience d'HIF-1 α sur les cellules souches embryonnaires *in vivo*.

En accord avec le fait que des zones hypoxiques sont détectées au niveau du cœur et du tube neural à un stade précoce du développement embryonnaire qui colocalisent spatio-temporellement avec HIF-1 α et le facteur VEGF (Lee et coll., 2001), deux équipes indépendantes ont montré que la délétion constitutive du domaine bHLH dans HIF-1 α chez la souris induit *in vivo* un arrêt du développement et une létalité associée à des malformations cardiovasculaires, des altérations du tube neural et une mort cellulaire dans le mésenchyme céphalique (Iyer et coll., 1998; Ryan et coll., 1998). Le degré de sévérité de ces altérations est corrélé aux niveaux d'expression d'HIF-1 α normalement retrouvés dans les embryons sauvages à E8,5 et E9,5 (Iyer et coll., 1998).

Le développement de souris knock-out conditionnel qui utilise le système Cre/LoxP a ensuite permis d'étudier plus spécifiquement le rôle d'HIF-1 α dans la neurogenèse *in vivo*. Dans ces souris modèles, l'expression de la recombinase Cre se retrouve sous la dépendance du promoteur nestine qui est exprimé dans les cellules souches neurales (voir chapitre II 4.1.). La délétion d'HIF-1 α se fera donc spécifiquement dans ces cellules exprimant la nestine.

Le premier modèle décrit en 2003 par Tomita et coll. repose sur la délétion des exons 13-15 d'HIF-1 α qui codent le domaine de transactivation COOH terminale (voir chapitre I) essentiel pour la réponse à l'hypoxie et pour la localisation nucléaire d'HIF-1 α . Cette délétion génère un gène qui produit une protéine HIF-1 α tronquée fonctionnellement inerte (Tomita et coll., 2003).

Le deuxième modèle développé s'appuie sur la délétion de l'exon 2 d'HIF-1 α qui abolit l'activité transcriptionnelle d'HIF-1 α par la délétion du domaine bHLH, nécessaire à l'interaction avec les domaines HRE de ses gènes cibles (Voir chapitre I). Ce modèle a été utilisé jusqu'à maintenant pour étudier l'effet de l'absence d'HIF-1 α dans la neurogenèse adulte (Li et coll., 2014).

Grâce à la perte fonctionnelle d'HIF-1 α dans les cellules souches neurales qui expriment la nestine, Tomita et coll., ont mis en évidence que malgré une apparence extérieure normale du cerveau embryonnaire, les embryons déficients pour HIF-1 α avaient un télencéphale dont l'épaisseur diminuait avec le stade de développement, en relation avec une diminution du nombre de cellules corticales détectable dès E19. Ces auteurs ont pu montrer que la mort des cellules neurales par apoptose coïncidait avec la régression vasculaire dans le télencéphale d'embryons mutants. Enfin, le phénotype associé à la perte d'HIF-1 α est restauré par l'expression *in vivo* d'HIF-1 α dans les embryons (Tomita et

coll., 2003). Ces résultats obtenus *in vivo* mettaient ainsi pour la première fois en évidence que l'expression d'HIF-1 α dans les cellules neurales était nécessaire au développement normal du cerveau.

Plus récemment, ce même modèle de souris a permis de montrer que l'absence d'HIF-1 α n'altère pas la neurogenèse, la prolifération et la différenciation des progéniteurs dopaminergiques induits par d'importants niveaux d'oxygène (Wagenführ et coll., 2016). Cette même équipe avait par ailleurs montré qu'HIF-1 α ne semblait pas intervenir dans la formation des progéniteurs apicaux exprimant Sox2 dans la ZV (Wagenführ et coll., 2015).

Enfin, en 2016, Lange et coll., ont montré en générant des embryons avec une délétion conditionnelle d'HIF-1 α restreinte aux GR du prosencéphale dorsal (souris Emx1-Cre) que la différenciation des GR au stade E13,5 de développement est augmentée chez les embryons déficients pour HIF-1 α . Au contraire, la surexpression transitoire d'HIF-1 α induite par une électroporation *in utero* provoque un retard dans la différenciation ainsi qu'un maintien de l'expansion des GR (Lange et coll., 2016).

6.3.2. Au niveau des cellules souches neurales adultes

Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* montrent également l'importance d'HIF-1 α dans le maintien des cellules souches neurales adultes. En condition physiologique, HIF-1 α est exprimé dans les zones hypoxiques où sont localisées les niches de cellules souches neurales adultes (Cunningham et coll., 2012). *In vivo*, la délétion globale d'HIF-1 α (gHIF-1 $\alpha^{\text{floX/floX}}$) provoque dans le gyrus denté des souris adultes (de 7 à 8 semaines) une diminution du nombre des neurones DCX positifs (marqueur neuronal) qui ont par ailleurs réduit fortement leur capacité à former des neurites, essentielles pour l'intégration des neurones néoformés dans le circuit neuronal (Mazumdar et coll., 2010). Dans cette même étude, la délétion d'HIF-1 α au niveau des cellules souches neurales adultes de souris nHIF-1 $\alpha^{\text{floX/floX}}$, dans lesquelles l'expression de la Cre est sous la dépendance du promoteur de l' α CamKII, provoque une diminution de plus de deux fois du nombre de cellules souches proliférantes BrdU⁺ ainsi que des neurones néo-formés dans la zone sous-granulaire du gyrus denté (Mazumdar et coll., 2010).

HIF-1 α est aussi impliqué dans le maintien des cellules souches neurales adultes *via* la préservation de la vascularisation de la niche des cellules neurales de la ZSV adulte. En effet, 45 jours après la délétion d'HIF-1 α dans les cellules nestine-positives, Li et coll. ont mis en évidence une

déplétion des cellules souches neurales au niveau de la ZSV qui fait suite à la régression vasculaire. Cette étude suggère donc un rôle indirect d'HIF-1 α dans le contrôle des cellules souches neurales adultes par le maintien de la vascularisation de la niche (Li et coll., 2014). En revanche, l'autorenouvellement des cellules souches neurales adultes en culture *ex vivo* n'est pas altéré par l'absence d'HIF-1 α (Li et coll., 2014).

III. La migration/invasion radio-induite dans le Glioblastome

1. Les gliomes et le glioblastome multiforme

1.1 Gliomes

Les gliomes qui représentent la tumeur primitive la plus commune chez l'adulte est associée à une prévalence d'environ 5 à 8 cas pour 100 000 personnes avec une prédominance masculine touchant tous les âges mais retrouvée d'une manière plus importante chez les personnes ayant un âge compris entre 40 et 65 ans (Schneider et coll., 2010 ; Zouaoui et coll., 2012). Le glioblastome, la forme la plus commune des tumeurs du cerveau et du SNC (55,1 % des gliomes) touche 3 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes (Ostrom et coll., 2015).

A l'heure actuelle, il existe plusieurs classifications qui répertorient les différents gliomes à différenciation astrocytaire, plus communément appelés glioblastomes.

La classification de l'OMS classe les gliomes par ordre croissant de grade selon différents critères histopathologiques qui sont directement corrélés à leur degré de malignité et par conséquent à la durée de survie des patients (classification de l'OMS, Louis et coll., 2007). On distingue :

- les astrocytomes de bas grade I (astrocytomes pilocytiques et sous-ependymaires à cellules géantes),
- les astrocytomes de grade II (astrocytomes pilomyxoïdes ou diffus, xanthoastrocytomes pléomorphes),
- les astrocytomes de grade III ou anaplasiques
- et les astrocytomes de grade IV encore appelés glioblastomes ou glioblastomes multiformes (GBM) (Louis et coll.,2007) qui représentent la catégorie de gliome la plus fréquente (entre 60 et 70% des gliomes (Wen et Kesari 2008) et presque la moitié des cancers du SNC (Ostrom et coll., 2014).

Une autre classification développée par l'Hôpital Saint-Anne repose sur l'examen anatomo-pathologique et sur l'analyse d'image en IRM (Daumas-Duport, 2008). Brièvement, cette classification regroupe trois catégories : 1 - les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes sans hyperplasie endothéliale et sans prise de contraste de grade A, 2 - les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade B avec hyperplasies et/ou prise de contraste et 3- les glioblastomes.

1.2. Le glioblastome multiforme

1.2.1. Définition et aspect pathologique du glioblastome multiforme

Le GBM appartient au groupe des astrocytomes de grade IV et est caractérisé par une croissance cellulaire rapide et agressive dont le développement se fait entre 3 et 6 mois. Il affecte généralement les adultes et est caractérisé par une masse tumorale et des lésions infiltrantes importantes dans l'ensemble du cerveau avec une localisation préférentielle dans les hémisphères frontaux et temporaux. C'est le type le plus commun et le plus mortel des tumeurs cérébrales malignes primaires, avec un taux de survie médian du patient se situant entre 15 à 17 mois (Wen et Kesari, 2008 ; Stupp et coll., 2009).

Du point de vue histologique, les GBM sont hétérogènes (d'où le nom de glioblastome multiforme) entre eux, mais également au sein d'une même tumeur. Les GBM présentent cependant des caractéristiques anatomo-pathologiques communes qui sont : 1 - une densité et une prolifération cellulaire importante, 2 - une hyperplasie vasculaire et 3- la présence de zones nécrotiques très développées entourées de cellules tumorales en migration formant une structure dite en palissade (Figure 25).

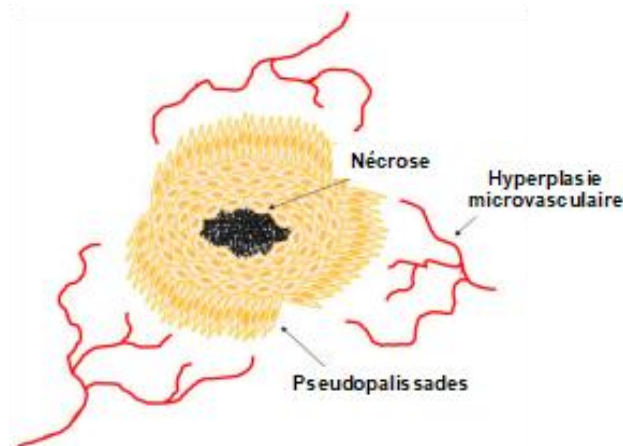


Figure 25: Les caractéristiques anatomopathologiques du GBM. Le GBM est caractérisé par des foyers nécrotiques entourés de cellules en palissades et d'une hyperplasie micro-vasculaire. Les palissades sont créées par les cellules tumorales qui migrent du centre de la tumeur en région hypoxique pour former un front invasif. L'hyperplasie vasculaire est une forme exacerbée de l'angiogenèse qui se produit suite à la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques (ex VEGF) (Monteiro et coll., 2017).

Plus de 90 % des GBM sont dits « primaires » à savoir qu'ils se forment *de novo* de façon sporadique sans être associés à des prédispositions génétiques familiales, alors que les GBM dits

« secondaires » proviennent généralement de l'évolution d'astrocytomes de grades inférieurs II ou III (Goodenberger et Jenkins 2012). Par comparaison, le GBM secondaire se développe chez des patients plus jeunes (45 ans *versus* 65 ans pour le GBM primaire) avec une évolution clinique lente qui peut s'étendre sur une dizaine d'années. Ces deux types de GBM sont histologiquement identiques mais ils expriment des altérations et des profils génomiques différents (Ohgaki et Kleihues, 2013, Cambruzzi, 2017).

Ces dernières années, des études de génomiques et de transcriptomiques réalisées sur un grand nombre de GBM ont permis de caractériser leurs altérations génétiques et moléculaires spécifiques et de confirmer leur hétérogénéité (Verhaak et coll., 2010, Brennan et coll., 2013).

Ces données ont permis d'établir à partir d'anomalies génétiques récurrentes trois principaux sous-types de gliome : prolifératif, pro-neural et mésenchymateux (Phillips et coll., 2006 ; Verhaak et coll., 2010). Chaque sous-type est associé à une signature génétique et épigénétique spécifique qui pourrait permettre à terme d'adapter plus spécifiquement le traitement en fonction du sous-type de gliomes, comme cela avait déjà pu être suggéré avant ce type d'études (Mischel et coll., 2003 ; Newton et coll., 2004 ; Rao et coll., 2003, Van Meir et coll., 2010).

1.2.2. Prise en charge thérapeutique du glioblastome multiforme (GBM)

Classiquement, le traitement d'un glioblastome est dans un premier temps chirurgical par exérèse la plus complète possible en fonction des contraintes fonctionnelles et de la localisation de la tumeur. Une appréciation du volume de l'éventuel résidu tumoral se fait par IRM dans les 72 heures suivant la chirurgie. Suite à cette résection chirurgicale, un traitement par radiothérapie conformationnelle (30 fractions de 2 Gy par jour, à raison de 5 jours par semaine pendant 6 semaines) associée à de la chimiothérapie avec de la Témazolomide (TMZ, Témodal® : 75 mg/m²/j pendant 6 semaines) est mis en place. La chimiothérapie adjuvante commence quatre semaines après la fin de la radiothérapie.

Une étude clinique de phase III a démontré que l'association entre chimiothérapie et radiothérapie permettait de prolonger la survie globale médiane (SG) des patients de 2,5 mois par rapport à celle des patients uniquement traités par radiothérapie (Stupp et coll., 2005). Ce protocole est actuellement le traitement standard proposé pour traiter un glioblastome nouvellement diagnostiqué.

Malgré cette avancée, le traitement des GBM reste difficile, ils sont donc à l'heure actuelle toujours considérés comme des tumeurs qui restent incurables du fait de leur résistance multifactorielle aux traitements.

1.2.3. Résistances des glioblastomes multifformes aux traitements

Contrairement à d'autres types de tumeurs, les glioblastomes sont très résistants aux traitements conventionnels de chimiothérapie et de radiothérapie. Cette résistance aux traitements peut s'expliquer à la fois par des facteurs intrinsèques de la cellule tumorale et par des facteurs extrinsèques liés à l'environnement tumoral. La présence de cellules souches cancéreuses au sein du GBM doit également être prise en considération dans ce phénomène de résistance aux traitements (voir chapitre III 1.3.2.).

1.2.3.1. Chimiorésistance des GBM

L'efficacité de la chimiothérapie dépend en partie des systèmes de réparation de l'ADN qui permettent à la cellule de répondre favorablement ou non à la TMZ. Parmi ces systèmes, l'enzyme méthylguanine-méthyltransférase (MGMT) est décrite comme limitant l'action de la TMZ en facilitant la réparation des lésions induites dans les cellules de glioblastome. Au contraire, la méthylation de son promoteur qui est retrouvée chez environ la moitié des patients ayant un glioblastome est associée à une réponse favorable à la TMZ (Hegi et coll., 2005, 2008). Le statut de méthylation de la MGMT représente donc actuellement le premier marqueur moléculaire de significativité pronostique et prédictive pour le glioblastome (Shaich et coll., 2009).

L'absence d'un système MMR (Mismatch repair) fonctionnel qui est nécessaire au maintien de la fidélité de la réplication de l'ADN est également associée à une résistance à la TMZ (Zhang et coll., 2010, Yip et coll., 2009). En effet, le complexe MMR doit fonctionner correctement pour que la TMZ exerce sa fonction cytotoxique (Goellner et coll., 2011, Perazzoli et coll., 2015)

Enfin, l'inhibition de protéines impliquées dans le système de réparation par excision de base (BER, base excision repair) comme PARP1, permet d'augmenter la cytotoxicité de la TMZ dans les cellules de gliomes (Goellner et coll., 2011) suggérant que cette voie de réparation est capable de moduler l'efficacité de la chimiothérapie.

D'autres systèmes, indépendants des systèmes de réparation de l'ADN, ont également été décrits comme favorisant une chimiorésistance des glioblastomes. Parmi eux, sont retrouvés les systèmes de détoxification cellulaire comme les transporteurs à ATP Binding Cassette (ou transporteurs ABC) impliqués dans le transport de molécules de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. Il a ainsi été montré que la mutation du gène MDR1 qui code pour une glycoprotéine P (P-gp) est associée à une réponse plus favorable des patients au traitement à la TMZ (Schaich et coll., 2009). Ce transporteur jouerait un rôle dans la chimiorésistance des glioblastomes en permettant d'éliminer la TMZ hors des cellules tumorales.

1.2.3.2. Radiorésistance des GBM

A l'instar de la chimiothérapie, les GBM, contrairement à d'autres types tumoraux sont intrinsèquement résistants à la radiothérapie conventionnelle. Les tumeurs dites radiorésistantes sont définies comme étant des tumeurs qui présentent des récurrences après la radiothérapie. Au niveau clinique, cette radiorésistance du glioblastome se traduit par une récurrence rapide après la radiothérapie ou par une absence de régression significative de la tumeur.

La résistance intrinsèque des GBM à la radiothérapie est entre autres associée à l'implication des mécanismes antioxydants qui permettent de lutter contre les radicaux libres. D'une manière générale, les glutathion peroxydase et réductase, SOD1 et SOD2 (Superoxydes Dismutases) sont retrouvés enrichis à des niveaux importants dans les cellules de glioblastomes (Zhong et coll., 1999). Par exemple, la faible expression de SOD1 chez les patients atteints de glioblastome augmente leur survie après la radiothérapie, alors qu'une expression élevée de SOD1 est associée à une survie plus faible (Yoshii et coll., 1999). De la même façon, l'augmentation de la glutathion S transférase diminue la survie des patients après radiothérapie suggérant que cette enzyme est associée à la radiorésistance des glioblastomes (Yoshii et coll., 2001).

Les systèmes de réparation de l'ADN jouent également un rôle dans la radiosensibilité et la survie des cellules cancéreuses de GBM. Ainsi, la surexpression des gènes de réparation Ku70 et Ku80 membres importants de la voie non-homologue de l'assemblage terminal (NHEJ) nécessaires à la réparation des cassures doubles brins de l'ADN induit une radiorésistance des cellules humaines de glioblastome (Otomo et coll., 2004). Les voies de signalisation des dommages de l'ADN peuvent également contribuer à la fois à la physiopathologie et à la radiorésistance des glioblastomes. Par

exemple, les protéines ATM et ATR, perdues dans 20 % des GBM et activées à la suite de cassures double brins permettant la réparation des cassures de l'ADN en agissant sur les protéines Chk1 et Chk2 régulatrices du cycle cellulaire participeraient à la radiorésistance des glioblastomes (Squatrito et coll., 2010, Chuah et coll., 2012).

L'hypoxie représente également un des facteurs extrinsèques majeurs impliqués dans la radiorésistance des GBM. En effet, l'hypoxie qui est retrouvée au niveau des GBM diminue l'efficacité de la radiothérapie (tout comme celle de la chimiothérapie) du fait de la trop faible quantité d'oxygène intratumorale pour induire une cytotoxicité. Parallèlement, l'hypoxie peut conduire indirectement à la résistance aux traitements par l'activation des facteurs de transcription HIF-1 α qui contrôlent la transcription de nombreux gènes notamment impliqués dans l'invasion tumorale (Chapitre I). L'implication de HIF-1 α dans la progression tumorale et plus spécifiquement au niveau du GBM sera décrit par la suite (Chapitre III 1.4.).

1.2.3.3. Rôles des cellules souches de glioblastome dans les récurrences des GBM

La radiorésistance des glioblastomes a été pour la première fois corrélée à l'existence de cellules souches cancéreuses par Bao et coll., en 2006. Ces auteurs ont montré que les cellules souches de gliomes CD133⁺ résistaient à l'irradiation, *via* leur capacité accrue à réparer l'ADN faisant suite au stress radiatif (Bao et coll., 2006). L'implication des différents mécanismes de migration/invasion radio-induite et du caractère souche de ces cellules cancéreuses dans la radiorésistance des GBM sera décrite dans la partie suivante (chapitre III 1.3.2.).

1.3. Les cellules souches de gliomes (CSG)

1.3.1. Caractéristiques des cellules souches de gliomes

La présence de cellules souches cancéreuses a été décrite pour la première fois dans les glioblastomes par Ignatova et coll en 2002. Ces auteurs ont réussi à isoler et à mettre en culture des cellules cancéreuses capables de proliférer sous forme de sphères en présence de facteurs de croissance EGF et FGF-2 à partir de biopsies de GBM, en se basant sur un modèle *in vitro* de culture des cellules souches neurales (Ignatova et coll., 2002). Ces résultats ont été rapidement confirmés par d'autres

équipes (Galli et coll., 2004, Singh et coll., 2004, Yuan et coll., 2004) et ont été élargis à d'autres types de cancers du cerveau (Hemmati et coll., 2003). Comme toutes les cellules souches cancéreuses (CSC), les cellules souches de gliomes (CSG) qui représentent une petite sous-population cellulaire au sein du glioblastome ont des caractéristiques communes avec les CSC d'origines tissulaires différentes (hématopoïétique, sein, ...) à savoir : 1- une capacité de s'auto-renouveler de manière quasi illimitée en culture *in vitro* sous forme de sphères ou en adhérence (pour les CSG) , 2- une multipotence leur permettant de se différencier et 3 - et un pouvoir tumorigène révélé par leur capacité à générer des tumeurs quand elles sont transplantées *in vivo* chez l'animal.

Outres ces caractéristiques communes avec les CSC, les CSG ont également des caractéristiques communes avec les cellules souches neurales (CSN) qui sont : 1- leur nombre est restreint au sein du tissu, 2 - l'expression de marqueurs de cellules souches comme les protéines de surfaces CD133, CD15, CD44, le filament intermédiaire nestine, et les facteurs de transcription Sox2 et Oct4 (Stopschinski et coll., 2013), et 3- leur multipotence (Ignatova et coll., 2002 ; Lathia et coll., 2015). De même et malgré la variété et l'étendue des anomalies génomiques retrouvées dans les CSG, elles présentent un profil transcriptomique similaire à celui des CSN. En effet, ces deux types de cellules ont en commun un certain nombre de voies moléculaires nécessaires au maintien de leurs propriétés d'autorenouvellement (Gangemi et coll., 2009).

La présence de niches de CSC a été montrée *in vivo* dans plusieurs tumeurs cérébrales primaires de grade élevé notamment chez les gliomes, les médulloblastomes, les épendymomes et les neuroblastomes. En plus d'avoir des similarités avec les CSN *in vitro*, les CSG utilisent des mécanismes communs de communication avec leur microenvironnement (Lathia et coll., 2011). Par exemple, les CSG sécrètent le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) qui stimule la croissance des cellules endothéliales pour soutenir un environnement vasculaire local (Gilbertson et Rich, 2007). À leur tour, les cellules endothéliales expriment des ligands Notch qui peuvent stimuler les récepteurs Notch essentiels à la maintenance des CSG (Fan et coll., 2010). En condition physiologique normale, les CSN se situent dans un microenvironnement vascularisé appelé "niche" qui favorise le maintien de leurs caractéristiques souches. Le même concept de « niche » a été suggéré pour les CSC de divers types de tumeurs et notamment de tumeurs solides dont le glioblastome (Sneddon et Werb, 2007).

1.3.2. Rôle des CSG dans la résistance à la radiothérapie

Il est maintenant admis que les cellules souches de gliomes sont essentiellement localisées dans les zones hypoxiques du GBM alors que les cellules de glioblastome « différenciées » sont situées dans les parties vascularisées périphériques de la tumeur (Gupta et coll., 2016). Pour survivre à la chimiothérapie et à la radiothérapie, les CSC sont capables d'activer de nombreuses réponses moléculaires et cellulaires comme par exemple la mise en place d'une TEM, l'induction de voies de signalisation qui régulent leur autorenouvellement et leur environnement tumoral, le contrôle de la quiescence cellulaire ou bien encore l'induction de modifications épigénétiques (Phi et coll., 2018 ; Figure 26).

C'est en 2006 que Bao et coll. ont apporté les premières preuves que la radiorésistance des GBM pouvait être associée à la présence de CSG au sein des GBM. Cette étude a montré que les CSG CD133⁺ contribuaient de manière importante à la radiorésistance des GBM par une activation préférentielle des points de contrôle du cycle cellulaire et une augmentation de leurs capacités de réparation de l'ADN. Les auteurs ont ainsi démontré qu'après irradiation, la fraction de CSG CD133⁺ était enrichie dans les GBM par rapport à la population CD133⁻. Cette population cellulaire CD133⁺ était associée à une activation constitutive de plusieurs points de contrôle du cycle cellulaire comme Chk1 et Chk2 et à une meilleure réparation des dommages à l'ADN provoqués par l'irradiation. L'inhibition spécifique de ces points de contrôle du cycle cellulaire qui provoque une radiosensibilité de la population des CD133⁺ confirme leur implication dans la radiorésistance (Bao et coll., 2006).

Une autre étude menée par Jamal et coll. en 2012 illustre parfaitement le fait que la radiorésistance des CSG peut dépendre du microenvironnement. Les auteurs ont mesuré le nombre de foyers γ H2AX et 53BP1 dans des CSG CD133⁺ et CD133⁻ irradiées afin d'évaluer leur radiosensibilité à la fois dans un contexte de culture *in vitro* et *in vivo* à l'aide de xénogreffes orthotopiques (Jamal et coll., 2012). De manière intéressante, ces auteurs ont mis en évidence que l'induction des foyers γ H2AX et 53BP1 était identique dans les populations CD133⁺ et CD133⁻ en culture *in vitro*, alors qu'*in vivo*, le nombre de foyers était significativement inférieur dans la population de CSG CD133⁺ par rapport à celui retrouvé dans les cellules CD133⁻ (Jamal et coll., 2012). Ces données suggèrent donc que le microenvironnement est capable d'influencer la radiorésistance des CSG.

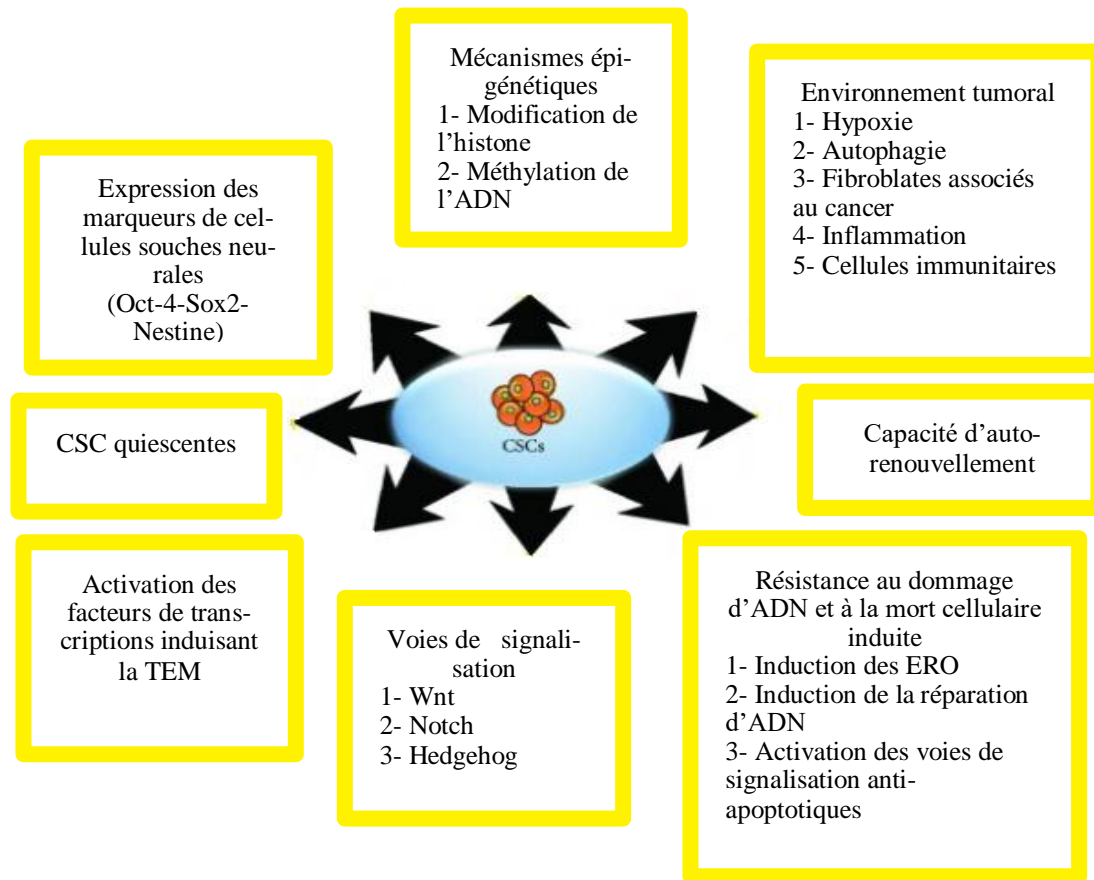


Figure 26: Les principales voies de signalisation et de modification qui contribuent à la résistance thérapeutique des CSC. La résistance des CSG aux agents thérapeutiques s'appuie sur la mise en place de nombreux mécanismes résumés dans cette figure. On y retrouve notamment la TEM, l'autorenouvellement, le contrôle de l'environnement tumoral, le maintien de la quiescence, des modifications épigénétiques. CSC : Cellules Souches Cancéreuses. TEM : Transition Epithéliale Mésoenchymateuse. ERO : Espèces réactifs à l'oxygène. ADN : Acide DésoxyRibonucléique (Adapté de Phi et coll., 2018).

La même année, Qiu et coll., ont montré à l'aide d'expériences d'invasion *in vitro* en utilisant différentes lignées de gliomes humains que les CSG avaient un pouvoir invasif supérieur à celui de leurs cellules respectives différenciées, même si leur invasivité n'était cependant pas corrélée au grade pathologique (Qiu et coll., 2011). Ces données de migration illustrent que les caractéristiques spécifiques de migration/invasion des CSG pourraient participer à la radiorésistance des CSG en favorisant leur échappement aux radiations.

Enfin, il est nécessaire d'évoquer le rôle important que l'hypoxie peut jouer au niveau des CSG car elle est associée à l'angiogenèse tumorale, à l'invasivité, à la résistance thérapeutique et au mauvais pronostic du GBM (Heddleston et coll., 2009, Li et coll., 2009, Marampon et coll., 2014, Kessler et coll., 2010, voir chapitre III 1.3.2.).

En conclusion, il est maintenant clairement établi que la présence de CSG dans les prend une part importante dans leur résistance aux thérapies conventionnelles qui incluent la radiothérapie et la chimiothérapie. Un des problèmes actuels concernant l'étude des mécanismes impliqués dans la radiorésistance des CSG reste que la plupart des études publiées ne prennent en compte qu'une seule voie de signalisation, sans forcément la mettre en relation avec les autres voies de signalisation déjà décrites comme pouvant jouer un rôle dans la modulation de la radiorésistance des CSG (Han et coll., 2017). D'autres recherches sont encore nécessaires pour mettre en lumière les multiples réseaux complexes qui contrôlent la radiorésistance intrinsèque des CSG. Il est également nécessaire de prendre en compte les nombreuses interactions qui se produisent entre les CSG et leur microenvironnement. Enfin, l'hétérogénéité retrouvée au niveau des CSG doit être également prise en compte, comme d'ailleurs celle qui caractérise leur environnement et qui peut sans aucun doute affecter leur la réponse des CSG aux traitements thérapeutiques (Ho et Shim, 2017).

1.4. Hypoxie et HIF-1 α dans le glioblastome multiforme et les cellules souches de gliomes

Au niveau des GBM, les régions hypoxiques qui sont spatialement hétérogènes favorisent cliniquement un phénotype malin et peuvent contribuer à l'hétérogénéité de la tumeur (Yang et coll., 2012). Ainsi, au sein d'une même tumeur de GBM, il existe des zones d'hypoxie modérée (0.1 à 0.5% pO₂) et des régions d'hypoxie moyenne (0.5% à 2.5% pO₂) (Evans et coll., 2004, 2009). Ces régions peuvent induire entre autres, une invasion vers les tissus sains du cerveau qui constitue un obstacle pour les thérapies et favorise les récurrences qui sont la plupart du temps fatales pour les patients. Des mesures stéréotaxiques réalisées à l'aide d'électrodes intracrânienne ont montré que la pression d'oxygène moyenne est de 9,2 mm Hg au niveau du GBM alors qu'elle atteint 17,9 mm Hg dans la zone péri-tumorale (Beppu et coll., 2002). Ces données obtenues *in vivo* sont en accord avec de précédentes études (Collingridge et coll., 1999, Rampling et coll., 1994) et confirment la présence d'un état hypoxique important au niveau des GBM.

L'infiltration tumorale est une des caractéristiques importantes du GBM. En effet, les cellules tumorales de GBM ont un pouvoir invasif important qui leur permet de diffuser vers l'hémisphère opposé, le long des fibres de la substance blanche du corps calleux. Ces infiltrations tumorales peuvent également être associées à une infiltration dans les zones sous piales et périvasculaires et à la formation

Au sein du glioblastome, HIF-1 α est localisé au niveau nucléaire, autour des zones nécrotiques et dans les zones infiltrées par la tumeur. La surexpression de HIF-1 α dans le GBM qui est aussi caractérisée au niveau transcriptionnel par rapport à d'autres grades de gliomes (Kaur et coll., 2005 ; Zagzag et coll., 2000) favorise la progression tumorale *via* l'augmentation du métabolisme, de l'angiogenèse et du nombre des cellules souches de gliomes (Yang et coll., 2012). L'expression des zones hypoxiques nécrotiques exprimant HIF-1 α est illustrée dans la Figure 28.

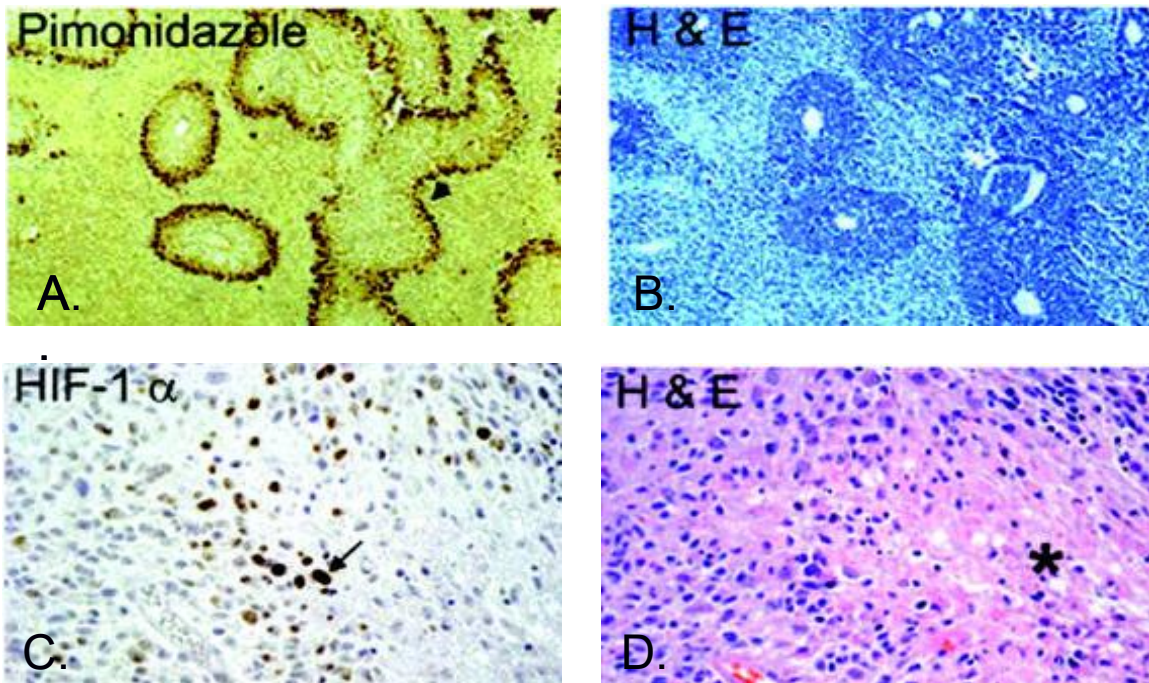


Figure 28: L'expression de HIF-1 α dans le GBM. A et B représentent des xénogreffes de gliome U87 à partir d'un modèle de tumeur cérébrale de rat. A, immunomarquage par le pimonidazole qui montre une bordure de cellules hypoxique viables à la périphérie des régions vasculaires (flèches) B. Coloration H & E (hématoxyline et éosine) correspondante de la zone A montrant de grandes zones de nécrose (bleu clair) C et D, Spécimen GBM humain. C. Cellules HIF-1 α -positives localisées dans les cellules pseudopalissades (flèches) D. H & E correspondant de la section adjacente montrant la zone de nécrose (astérisque) (Adapté de Kaur et coll., 2005).

Au sein du GBM, 77 % des cellules tumorales HIF-1 α positives expriment le VEGF (Facteur de croissance vasculaire endothéliale) et le PDGF-C (Facteur de croissance dérivé des plaquettes) contrairement aux cellules tumorales HIF-1 α négatives (Clara et coll., 2014). Cette étude a établi que l'expression nucléaire de HIF-1 α /VEGF est associée à un faible taux de survie des patients atteints de GBM par rapport à celui des patients atteints par un GBM associé à la présence de cellules tumorales HIF-1 α /VEGF négatives (Clara et coll., 2014).

1.4.1. Implication de HIF-1 α dans les CSG

En hypoxie, HIF-1 α est impliqué dans le maintien et l'induction de la capacité d'autorenouvellement des cellules souches de gliomes CD133⁺ (Figure 29) alors que sa sous-expression inhibe leur expansion (Qiang et coll., 2012 ; Soeda et coll., 2009). Ainsi, une hypoxie à 1% d'O₂ durant 72 heures augmente le potentiel clonogénique des neurosphères et augmente de vingt fois l'expression des marqueurs de cellules souches comme CD133, Klf4 et Sox2 et des membres de la voie Notch. L'augmentation de l'expression CD133 a par ailleurs été montrée comme dépendante de HIF-1 α (Bar et coll., 2010). Ces résultats suggèrent donc que HIF-1 α joue un rôle important dans la prolifération et la croissance tumorale des CSG induites par l'hypoxie (Bar et coll., 2010).

En dépit du rôle important de HIF-1 α au niveau des CSG, il a été montré que HIF-2 α joue également un rôle dans la tumorigénicité des CSG et que le degré d'hypoxie dans la niche influence différemment l'expression des deux facteurs HIF-1 α et HIF-2 α . Dans des conditions hypoxiques sévères HIF-1 α est exprimé dans les CSN et dans les CSG alors qu'en hypoxie légère HIF-2 α est surexprimé dans les CSG par rapport aux cellules tumorales non souches ou aux progéniteurs neuronaux fœtaux humains (Binello et Germano, 2011 revue). McCord et coll. ont démontré qu'une hypoxie *in vitro* à 7% entraîne une augmentation de l'expression des marqueurs de cellules souches nestine, CD133, Sox2 et Oct4 et HIF-2 α , mais pas HIF-1 α dans les cellules souches de glioblastome par rapport à la condition de 20% d'oxygène (McCord et coll., 2009). Li et ses coll. suggèrent que HIF-2 α représenterait un médiateur plus sélectif de la réponse des CSG à l'hypoxie (Li et coll., 2009). Dans cette étude, les auteurs ont montré que HIF-2 α est spécifiquement surexprimé en normoxie et en hypoxie dans les CSG mais pas par les CSN, alors que HIF-1 α est retrouvé dans ces deux populations cellulaires (Li et coll., 2009). Bar et coll. ont par ailleurs montré dans des CSG qu'en combinaison avec l'induction de la protéine HIF-1 α en hypoxie, l'expression de HIF-2 α est induite de manière plus sélective au niveau transcriptionnel (Bar et coll., 2010).

L'ensemble de ces études mettent en évidence les deux sous-unités α de HIF (HIF-1 α et HIF-2 α) joueraient un rôle important dans le maintien des CSG confirmant de plus que leur surexpression pourrait être associée à un mauvais pronostic et à un taux de survie diminué des patients (Bertout et coll., 2008 ; Keith et coll., 2011 ; Semenza et coll., 2011).

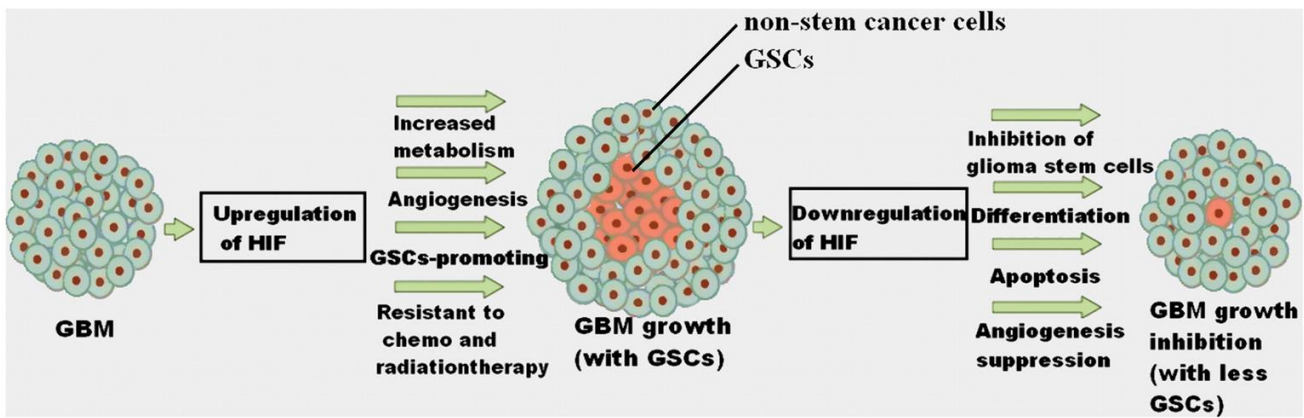


Figure 29: Implication de HIF dans prolifération des CSG. En condition hypoxique, le niveau de HIF1 est augmenté ce qui provoque une progression maligne du GBM en favorisant la prolifération des CSG, l'angiogenèse, l'augmentation du métabolisme et la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Au contraire, la diminution d'expression de HIF diminue la croissance tumorale des GBM en inhibant les CSG et l'angiogenèse tout en favorisant la différenciation et l'apoptose (Yang et coll., 2012).

2. La migration et l'invasion radio-induite

En association avec la chimiothérapie, la radiothérapie représente une prise en charge importante dans le traitement du GBM (Stupp et coll., 2005, Wen et Kesari, 2008). Malgré les efforts importants faits pour améliorer et trouver de nouveaux protocoles et techniques de radiothérapie permettant à terme d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients atteints d'un GBM, la quasi-totalité des patients traités (plus de 90 %) présente des récurrences locales qui s'expliquent entre autres par la reprise de la prolifération tumorale et/ou par une invasion tumorale (Stupp et coll., 2009). A l'heure actuelle, un certain nombre de données cliniques et expérimentales suggèrent que ce processus métastatique local pourrait être paradoxalement provoqué par la radiothérapie (Moncharmont et coll., 2014).

La formation de métastase correspond à un phénomène séquentiel qui comprend une invasion initiale et locale qui commence par le détachement des cellules cancéreuses de la masse tumorale et la dégradation de la matrice par des protéases permettant la motilité cellulaire. Une fois mobiles, les cellules cancéreuses ont alors la possibilité de rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique par intravasation pour finalement intégrer le parenchyme d'un autre organe par extravasation (Mareel et coll., 2009).

Les premières études de Krebs et coll. puis de Yamamoto et coll. dans les années 1930 sur les effets de radiations sur la migration tumorale et la métastase bien que suggestives, n'avaient pas permis

de conclure définitivement sur l'effet stimulant des rayonnements ionisants sur la migration de cellules tumorales (Krebs, 1930 ; Yamamoto, 1936). C'est réellement à la fin des années 1950 que Kaplan et Murphy ont démontré que des irradiations uniques (entre 4 et 10 Gy) de carcinomes implantés chez la souris étaient capables d'induire 6 semaines après l'irradiation, une augmentation du pourcentage de métastases pulmonaires (Kaplan et Murphy, 1949). C'est en 1991 que Von Essen va compiler pour la première fois l'ensemble des résultats concernant l'apparition de cellules métastatiques induite par des irradiations ionisantes. Dans cette revue, Von Essen regroupe une quarantaine de publications qui s'intéressent à l'effet de l'irradiation locale de la tumeur sur le comportement métastatique dans différents systèmes expérimentaux (F Von Essen, 1991). Il rapporte également des données concernant les effets de l'irradiation du tissu normal sur le comportement métastatique montrant une localisation préférentielle des métastases au niveau des tissus normaux irradiés (F Von Essen, 1991).

Depuis, de nombreuses études majoritairement réalisées *in vitro* ont pu montrer dans différentes lignées tumorales d'origines tissulaires variées que les rayonnements ionisants étaient capables de favoriser les capacités de migration et d'invasion des cellules tumorales survivantes (Tableau 4). Dans de nombreux cas, les auteurs se sont intéressés à déterminer les acteurs moléculaires et/ou les voies de signalisation nécessaires à cette migration radio-induite dans un contexte donné. Les résultats de ces études ont été récemment repris dans trois revues (Moncharmont et coll., 2014, Fujita et coll., 2015 ; Sundahl et coll., 2018). Cependant, malgré ce nombre croissant de données expérimentales qui documentent les effets de l'irradiation sur le pouvoir métastatique et la migration des cellules tumorales, il subsiste un certain scepticisme en radio-oncologie quant à la signification de ces résultats. En effet, même si un certain nombre de mécanismes ont pu être identifiés, ces derniers ont été principalement observés *in vitro* ou *ex vivo* dans des lignées cellulaires immortalisées (Moncharmont et coll., 2014, Fujita et coll., 2015). D'autre part, ce scepticisme est également dû au manque de données cliniques démontrent clairement l'existence de ce processus chez des patients atteints d'un cancer et soignés par radiothérapie conventionnelle (Vilalta et coll., 2016).

Quoi qu'il en soit, toutes ces études ont mis en évidence une multitude de voies moléculaires impliquées dans les processus d'invasion et de métastase radio-induite (Figure 30) (Falk et coll., 2014, Moncharmont et coll., 2014, Vilalta et coll., 2016, Sundahl et coll., 2018). Parmi ces acteurs moléculaires, certains pourraient représenter des cibles thérapeutiques permettant d'améliorer la réponse à la radiothérapie (Sundahl et coll., 2018)

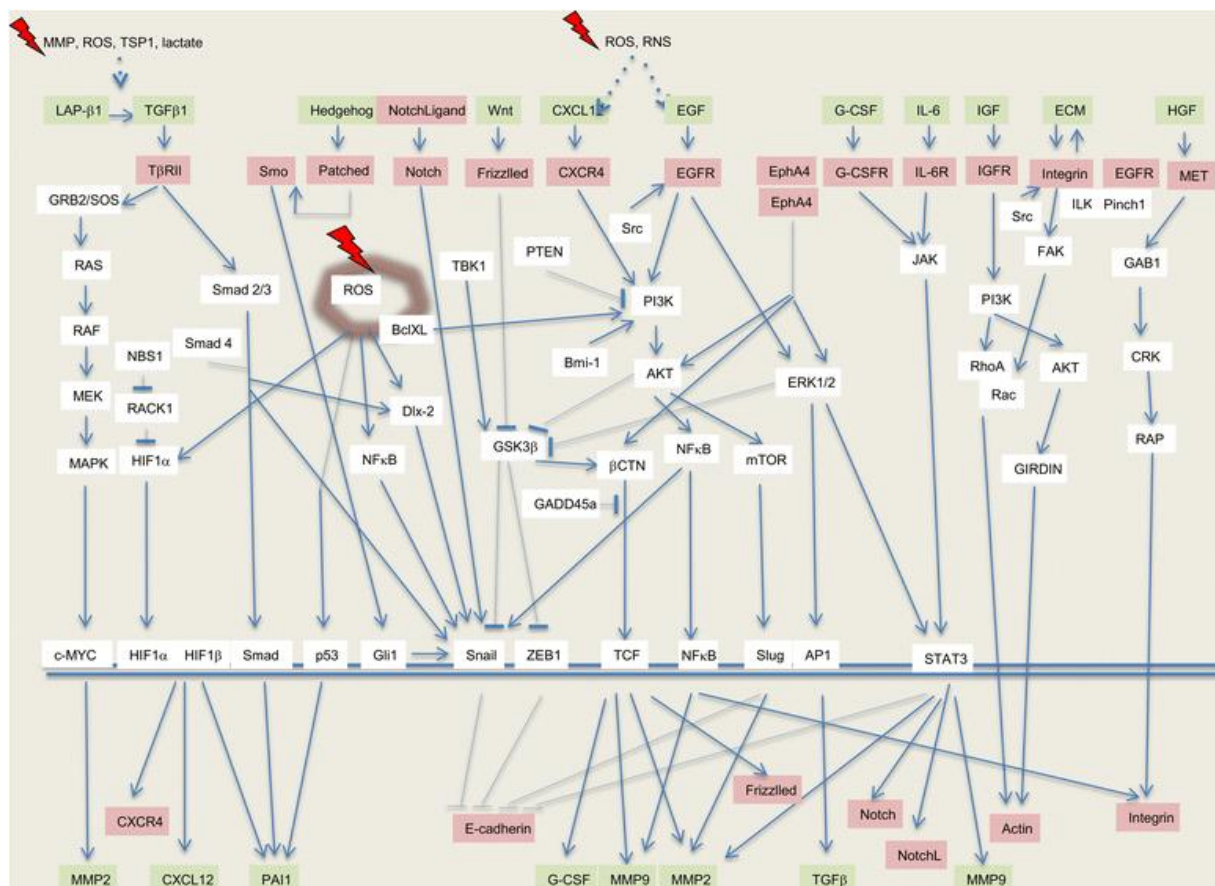


Figure 30: Les voies moléculaires impliquées dans la migration/invasion des métastases radio-induites (Sundahl et coll., 2018).

2.1. Mécanismes moléculaires impliqués dans la migration radio-induite des cellules cancéreuses

Comme précédemment illustré (Figure 30), les voies ou mécanismes décrits comme étant impliqués dans la migration/invasion radio-induite sont nombreux et variés et peuvent dépendre du type cellulaire et de la dose d'irradiation (unique ou séquentielle). Les tableaux suivants récapitulent la plupart des études qui ont mis en évidence ces mécanismes. Le Tableau 4 regroupe les études menées sur des lignées tumorales d'origines diverses (foie, poumon rein, pancréas) et le Tableau 5 s'intéresse plus spécifiquement aux données obtenues sur lignées de cellules de glioblastome (Tableau 5).

Tissus d'origine	Lignée cellulaire	<i>In vitro</i> ou <i>ex vivo</i>	Dose d'irradiation (source)	Migration/ invasion	Mécanisme	Référence
Poumon	MCF-7 H1299	<i>In vitro</i>	5 Gy (γ)	\uparrow/\uparrow	Augmentation de NSB1 et de HIF-1 α	Kuo et coll., 2015
	H1299 A549 H460	<i>In vitro</i>	2 Gy en 1 fraction (X)	ND/ \uparrow	Augmentation de HIF-1 α / ROS qui augmentent SDF-1/ CXCR4 qui activent PI3K/pAkt et MAPK/pERK1/2	Gu et coll., 2015
	A549 EBC-1	<i>In vitro</i>	0.5 Gy en 1 fraction 2 Gy en 1 fraction 8 Gy en 1 fraction (Carbon ion)	\downarrow/\downarrow	Suppression de l'ANLN (homologue de l'anilline)	Akino et coll., 2008
	A549	<i>In vitro</i>	1 Gy (γ)	\uparrow/\uparrow	Induction de connexin-43 et p38-MAPK	Ghosh et coll., 2014
	Carcinome de Lewis	<i>In vivo</i>	30 Gy en 1 fraction (γ) 40 Gy en 1 fraction (γ) 40 Gy en 2 fractions (γ) 50 Gy en 5 fractions (γ)	ND/ \uparrow	Induction de MMP-2	Camphasuen et coll., 2001
	Carcinome de Lewis	<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i>	2.5 Gy en 1 fraction 5 Gy en 1 fraction 7.5 Gy en 1 fraction 10 Gy en 1 fraction 50 Gy en 5 fractions (γ)	ND/ \uparrow à 7,5 Gy Métastase augmentée à 50 Gy (p<0.01)	Induction de MMP-9	Chou et coll., 2012
	A549	<i>In vitro</i>	6 Gy en 1 fraction 12 Gy en 1 fraction (γ)	\uparrow /ND	Augmentation de p38 MAPK	Jung et coll., 2007
	NSCLC	<i>In vitro</i>	4 Gy en 1 fraction	\uparrow/\uparrow	Induction de Nrf2/Notch	Zhao et coll., 2017
	A549	<i>In vitro</i>	10 Gy en 1 fraction (X)	ND/ \uparrow	Augmentation de integrin β 1	Ishihara et coll., 2010
Foie	Huh7	<i>In vitro</i>	15 Gy en 1 fraction (γ)	\uparrow/\uparrow	Induction de la métalloprotéinase-17 (ADAM17)	Hong et coll., 2016
	HepG2 Huh7 Hep3B	<i>In vitro</i>	5 Gy en 1 fraction(γ) 7.5 Gy en 1fraction (γ) 10 Gy en 1 fraction (γ)	ND/ \uparrow à 7,5 Gy	Induction de MMP-9 via PI3K/Akt/NF-kappaB	Cheng et coll., 2005
	Hela	<i>In vitro</i>	1 Gy (γ)	\uparrow/\uparrow	Induction de connexin-43 et p38-MAPK	Ghosh et coll., 2014
Pancréas	AsPC-1 BxPC-3 MIAPaCA-2	<i>In vitro</i>	2 Gy en 1 fraction (carbon ion)	\downarrow/\downarrow	Dégradation de Rac1/RhoA	Fujita et coll., 2015

	MIAPaCA-2 Panc-1	<i>In vitro</i>	0,5 Gy 1 Gy 2 Gy 4 Gy (carbon ion)	ND/↑	PI3K-AKT RhoA	Fujita et coll., 2014
	MIAPaCA-2 Panc-1 BxPC3 AsPC-2	<i>In vitro</i>	0,5 Gy 1 Gy 2 Gy 4 Gy (Carbon ion)	ND/↑MIAPa CA-2 ND/↓ Panc1, BxpC3, AsPC-2	SerP, plasmin, uPA	Fujita et coll., 2012
	MIAPaCA-2 Panc-1	<i>In vitro</i>	2 Gy in 1fraction 4 Gy in 1fraction (X)	Panc-1(→), MIAPa ↑à 2 Gy /↑	Induction de MMP-2	Fujita et coll., 2011
Sein	MCF7 SKBR3	<i>In vitro</i>	2 Gy en 3 fractions (γ)	↑/↑	Augmentation de la famille des protéines kinases SRC (EMT) et de PI3K/protéine kinase B et p38 MAPK	Kim et coll., 2015
	MDA-MB- 231 MDA-MB- 435S	<i>In vitro</i>	10 Gy en 1 fraction (IR)	↑/↑	Induction de l'oncogène MET via ATM-NF- κ B	De Bacco et coll., 2011
	MMTV PyVmT	<i>In vivo</i>	10 Gy en 1 fraction (X)	ND/↑	Induction de TGF- β	Biswas et coll., 2007
Carcinome tête et cou	HNSCC	<i>In vitro</i>	8 Gy en 1 fraction	↑/↑	Induction du système Kallikrein-kinin (BKB2R)	Beck et coll., 2012
Rectal	HT1080	<i>In vitro</i>	4 Gy en 1 fraction (γ)	ND/↑	Augmentation de MMP pour un temps limité	Speake Wj et coll., 2004
Peau	R-8	<i>Ex vivo</i>	10 Gy en 1fraction 15 Gy en 1 fraction (X)	ND/↑	Augmentation uPAR	Rofstad et coll., 2004
Rein	293T	<i>In vitro</i>	5 Gy (γ)	↑/↑	Augmentation de NSB1(supprime l'ub de HIF-1 α) et augmentation de HIF- 1 α	Kuo et coll., 2015
Meduloblasto me	DOAY D283	<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i>	7 Gy en 1 fraction (RS 2000 Biological Irradiator)	↑/↑	Augmentation de uPAR et integrin β 1/ FAK	Nalla et coll., 2010

Tableau 4: Effet de l'irradiation sur la migration et l'invasion cellulaire de lignées tumorales des différentes origines tissulaires et les mécanismes détectés dans ces processus (adapté de Falk et coll., 2014 et de Moncharmont., 2014, Sundahl et coll, 2018).

Lignée cellulaire	<i>In vitro</i> ou <i>ex vivo</i>	Dose d'irradiation	Migration/invasion	Mécanisme	Référence
U251 U81	<i>In vitro</i>	8 Gy en 1 fraction (X ray)	↑/↑	Induction de MMP-2	Badiga et coll., 2011
U251	<i>In vitro</i>	10 Gy en 1 fraction (X ray)	↑/↑	Induction de l'oncogène MET via ATM-NF-κB	De Bacco et coll., 2011
U87	<i>In vitro</i>	1 Gy en 1 fraction 3 Gy en 1 fraction 10 Gy en 1 fraction (X-ray and (12)C heavy ion)	↑ (3Gy)/ND	Induction de β1 et de β3 intégrine	Goetze et coll., 2007
U87	<i>In vitro</i>	8 Gy (intermittent sur 40 min) (Cyber knife like irr (IIR))	ND/↑	Induction de TGF-B et β1-integrin	Canazza et coll., 2011
U87 BMG-1	<i>In vitro</i>	1 Gy (γ)	↑/↑	Induction de connexin-43 et p38-MAPK	Ghosh S et coll., 2014
F98	<i>In vivo</i>	15 Gy (γ)	ND/↓	Utilisation de Meloxicam qui diminue MMP-2, IL-1β, IL-6, TGF-β1, TNF-α	Desmarais G et coll., 2015
C6L	<i>In vivo</i>	3 Gy (γ)	ND/↑	Augmentation de l'activité MMP	Park et coll., 2012
U87	<i>In vitro</i>	3 Gy (γ)	ND/↑	Activation de Wnt/caténine qui active MMP2-MMP9	Dong et coll., 2015
U87 MG GaMg	<i>In vitro</i>	U87: 5 Gy en 1 fraction GaMg : 10 Gy en 1 fraction (X ray)	↓/ND	Apoptose p53 dépendante en présence de TMZ aussi	Fehlauer et coll., 2007
C6 rat gliome *	<i>In vitro</i>	6 Gy en 1 fraction 12 Gy en 1 fraction (γ)	↑/ND	Diminution de FAK et paxillin et augmentation de p38 et JNK (cibles de Rac)	Hwang et coll., 2006
U87 U373 LN18 LN428	<i>In vitro</i>	1 Gy en 1 fraction 2 Gy en 1 fraction 3 Gy en 1 fraction 5 Gy en 1 fraction 10 Gy en 1 fraction (γ)	ND/↑(2/4 lignées)	Activation EGFR dépendant de Src/augmentation de p38/Akt/ et PI3K/Akt et MMP-2 et PTEN	Park et coll., 2006
U87MG, Ln229	<i>In vitro</i>	2 Gy en 1 fraction 10 Gy en 1 fraction (photon)	ND/↑ (2 Gy)	Augmentation de αvβ3 or αvβ5 intégrine	Rieken et coll., 2011
T98G U87MG	<i>In vitro</i>	2 Gy en 1 fraction (X ray)	↑/ND	Activation du canal BK qui active la CaMKII	Steinle et coll., 2011

U87MG LN18 LN229	<i>In vitro et ex vivo</i>	1 Gy en 1 fraction 3 Gy en 1 fraction 6 Gy en 1 fraction (γ)	\uparrow/\uparrow (3 et 6 Gy)	Induction de $\alpha V\beta 3$ integrin et altération de MMP2 et MMP-9, Bcl2	Wild-Bode et coll., 2001
U87 U373	<i>In vitro</i>	6 Gy en 3 fractions (2 Gy/jour) (γ)	ND/ \uparrow	Stabilisation de HIF-1 α par l'activation de MAPK	Kim et coll., 2014
T98G KMG4	<i>Ex vivo</i>	10 Gy en 1 fraction 20 Gy en 10 fractions (2Gy/jour) (X ray)	\uparrow/\uparrow	Augmentation de Snail (transition GM) via phosphorylation de GSK-3 β et ERK1/2 et induction de MMP-2, augmentation de TGF- β	Mahabir et coll., 2014
LN229 U87MG	<i>In vitro</i>	6 Gy	ND/ \uparrow	avB3 intégrine	Wick et coll., 2002
U251	<i>In vitro</i>	2 Gy	ND/ \uparrow	MMP/TIMP	Furmanova-Hollenstein et coll., 2013
C6L rat *	<i>In vitro</i>	1-7 Gy	ND/ \uparrow	MMP2	Park et coll., 2012
UN3 GM2	<i>In vitro et ex vivo</i>	2 - 8 Gy en 1 fraction (photon beams)	\uparrow/\uparrow	Activation EGFR et IGFR1 PI3K/ Rho signaling	Zhai et coll., 2006

Tableau 5: Effet de l'irradiation sur la migration et l'invasion cellulaire de lignées tumorales de glioblastome humain ou de rongeur (*) et les mécanismes détectés dans ces processus (adapté de Falk et coll., 2014 et de Moncharmont et coll., 2014 ; Sundahl et coll., 2018).

À partir de l'ensemble de ces données (Figure 30, Tableau 4 et 5), nous pouvons distinguer quelques grands mécanismes communs à la plupart des lignées cellulaires ont un rôle majeur dans la migration/invasion radio-induite :

- 1) la transition épithéliale mésenchymateuse associée à la sous-expression des E-cadhérines et à la surexpression des métalloprotéinases et des intégrines,
- 2) l'importance de l'expression de protéines qui régulent le cytosquelette cellulaire,
- 3) les phénomènes d'adhésion entre les cellules et la matrice extracellulaire (intégrines et MMP),
- 4) et la rupture de la matrice extracellulaire par les métallo-protéases.

2.1.1. La transition épithéliale mésenchymateuse

L'induction de la transition épithéliale mésenchymateuse (TEM) qui est décrite comme plus facile dans les cellules cancéreuses à haut potentiel métastatique, promeut ainsi le développement des métastases (Zhou et coll., 2011). Pendant ce processus, les cellules épithéliales perdent leur polarité et

acquièrent un phénotype mésenchymateux qui induit une migration cellulaire. La sous-expression de la protéine E-Cadhérine et la perte des jonctions intercellulaires stables qui initient ce processus a été décritE dans les cellules irradiées (Jung et coll., 2007 ; Lopez-Novoa et Nieto, 2009). Comme le montre les deux Tableaux 4 et 5, l'irradiation induit également cette transition épithéliale mésenchymateuse par la surexpression des métallo-protéases (MMP2, MMP9) dans différents types de cancers (Hong et coll., 2016 , Camphasuen et coll., 2001 , Fujita et coll., 2011 , Chou et coll., 2012 , Nalla et coll., 2010, Speake et coll., 2004, Ishihara et coll., 2010) ainsi que dans différentes lignées de gliomes (Badiga et coll., 2011, Goetze et coll., 2007, Canazza et coll., 2011, Desmarais et coll., 2015, Park et coll., 2012, Dong et coll., 2015, Gogineni et coll., 2011, Hwang et coll., 2006, Park et coll., 2006, Rieken et coll., 2011, Rieken et coll., 2011, Wild-Bode et coll., 2001, Mahabir et coll., 2014). Cette augmentation de la TEM est accompagnée d'une augmentation de la migration/invasion radio-induite (Tableau 4 et 5).

2.1.2. La réorganisation du cytosquelette

La migration des cellules cancéreuses s'effectue également par la réorganisation du cytosquelette, notamment par la variation de l'équilibre entre assemblage et désassemblage des microtubules cytoplasmiques qui impliquent l'actine. En altérant l'organisation de l'actine, l'irradiation induit la migration et l'invasion des cellules cancéreuses dans différents types cellulaires (Zhao et coll., 2017, Gu et coll., 2015, Nalla et coll., 2010 ; De Bacco et coll., 2011 ; Fujita et coll., 2011 ; Ghosh et coll., 2014 ; Fujita et coll., 2015; Zhai et coll., 2006).

Au contraire, la régulation dynamique de l'actine *via* la dégradation de GTP-Rac1 et GTP-RhoA est montrée comme inhibant la migration et l'invasion qui fait suite à une irradiation par les ions de carbone (Fujita et coll., 2015, Akino et coll., 2009).

2.1.3. L'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire

L'augmentation de l'invasion radio-induite est aussi associée à des mécanismes qui impliquent la régulation de la matrice extracellulaire (MEC) où les cellules tumorales infiltrantes dégradent la MEC *via* les enzymes de lyse cellulaire (MMP2 et MMP9) permettant d'augmenter leur pouvoir invasif et métastatique (Park et coll., 2006).

L'adhésion entre la cellule et la matrice extracellulaire se fait *via* des récepteurs transmembranaires d'adhésion appelés intégrines qui se lient à la matrice extracellulaire. Les intégrines contribuent à l'invasion et à la formation des métastases par la régulation de la motilité cellulaire, de la localisation et de l'activité des MMPs ainsi que par le contrôle de la survie cellulaire (Desgrosllier et Cheresch, 2010). Les intégrines sont liées à l'EGFR par des kinases appelées ILK (Integrin Linked Kinases) et plus particulièrement la protéine PINCH1 (cysteine-histidine-rich 1) qui forment des complexes multi-protéiques qui induisent l'invasion (Li et coll., 2013).

Des expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* montrent également que l'irradiation induit une surexpression des intégrines, une phosphorylation des FAK (Focal Adhesion kinase) et de la paxilline, qui sont de manière générale des acteurs importants de la migration cellulaire (Tsutsumi et coll., 2009, Nalla et coll., 2010, Gogineni et coll., 2011). Une forte corrélation a par exemple été montrée entre la surexpression des intégrines $\alpha\beta 5$ et la migration des cellules de gliomes (Rieken et coll., 2011). Contrairement aux photons, l'irradiation par les ions carbonés inhibe la migration par la sous-expression des intégrines à la surface cellulaire. Les MMPs sont aussi activées par la surexpression radio-induite des intégrines suggérant l'existence d'une relation réciproque entre la forme mésenchymateuse de la migration et la dégradation de la matrice extracellulaire (Wild-Bode et coll., 2001, Yao et coll., 2011).

2.1.4. La protéolyse de la matrice extracellulaire

La lyse de la matrice extracellulaire (MEC) par les cellules invasives est médiée par des enzymes protéolytiques comme les métallo-protéases MMP2, MMP9 et MT1-MMP1. Ces enzymes agissent en équilibre avec des inhibiteurs comme l' α -macroglobuline et les TIMPS (Tissue inhibitors of matrix metalloprotease). Outre leur rôle dans la dégradation de la MEC, ces protéases sont également capables de cliver le précurseur inactif du facteur de croissance TGF- β (Transforming growth factor-beta). Ainsi l'augmentation du TGF- β induite par les rayonnements ionisants est impliquée dans la migration radio-induite. L'irradiation augmente également l'activité de MMP9 *via* la transcription des NF- κ B (Nuclear factor-kappa B ; Cheng et coll., 2006). Il est intéressant de noter que l'augmentation radio-induite de l'activité promotrice, du niveau transcriptionnel et de la sécrétion protéique de MMP2 est associée à la migration radio-induite détecté dans les lignées de gliomes déficient pour PTEN (U87, U251, U373 et C6), ce qui n'est pas le cas dans des lignées témoins PTEN efficaces (LN18, LN428) (Park et coll., 2006). Au contraire, Wild-Bode et coll., ont montré que des cellules de gliomes sur-

expriment MMP2 et MT1-MMP, sous-expriment TIMP2 (inhibiteurs des protéases) et augmentent leur invasion cellulaire radio-induite indépendamment du statut de PTEN (Wild-Bode et coll., 2001). Dans des cellules cancéreuses du poumon (LLC-LM), l'irradiation augmente le niveau transcriptionnel et protéique ainsi que l'activité enzymatique de la MMP9 mais pas de la MMP2 (Chou et coll., 2012). L'implication du complexe β -caténine/TCF semble lier les MMP au phénotype de la TEM. Ainsi, dans les cellules de gliomes U87, l'irradiation augmente l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF induisant la surexpression des MMP2 et MMP9 (Dong et coll., 2015).

D'autres hydrolases sont également impliquées dans l'invasion radio-induite. C'est le cas notamment des protéases à sérines appelées activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) décrites dans les cellules cancéreuses de la peau R-8, (Rofstad et coll., 2004), des lignées DOAY et D283 de médulloblastome (Nalla et coll., 2010) et dans les cellules tumorales du pancréas (Fujita et coll., 2011). Comme mentionné précédemment, le TGF- β exerce un effet direct sur l'augmentation du nombre des métastases cancéreuses. Il a été montré que le niveau circulant de TGF- β est augmenté dans des souris qui présentent des métastases mammaires radio-induites, et ce indépendamment du site d'irradiation (thorax/pelvis). Dans cette étude, la prolifération des cellules cancéreuses circulantes est inhibée par des anticorps bloquants anti-TGF- β . De la même manière, une irradiation n'est plus capable d'augmenter le nombre de métastases chez les souris qui n'ont plus de récepteur au TGF- β de type II, ce qui suggère que l'augmentation des métastases implique directement le TGF- β (Biswas et coll., 2007).

2.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans la migration/invasion dépendante d'HIF-1 α

2.2.1. La migration/invasion en condition d'hypoxie

Plusieurs études montrent que HIF-1 α joue un rôle déterminant dans les phénomènes de migration/invasion cellulaires en condition d'hypoxie notamment dans des différentes lignées de glioblastome. Les résultats de ces études suggèrent qu'il pourrait jouer un rôle crucial dans la récurrence du GBM et dans les échecs thérapeutiques (Fujiwara et coll., 2007 ; Li et coll., 2013 ; Méndez et coll., 2010 ; Zhang et coll., 2013 ; Zhou et coll., 2013). Dans un modèle hypoxique de GBM, il a été rapporté que la géranylgeranyl transférase I (GGTI) régule l'expression de HIF-1 α et induit la migration et l'invasion des GBM. Cette régulation implique l'activation des RhoGTPases qui

sont souvent surexprimées ou mutées au niveau des tumeurs hypoxiques. Au contraire, l'inhibition de la GGTI inhibe la migration et l'invasion induites par l'hypoxie suggérant que le rôle que cette transférase pourrait avoir un rôle dans la migration des gliomes dépendants de HIF-1 α (Zhou et coll., 2013).

D'autres études ont montré dans les lignées de gliomes U87, SNB75 et U251, que la TEM induite par l'hypoxie est associée à l'accumulation nucléaire de HIF-1 α /HIF-2 α et ZEB1 (Siebzehnrubl et coll., 2013). Joseph et coll., en 2015 ont pu définir que HIF-1 α , et pas HIF-2 α , joue un rôle majeur dans l'induction de la TEM (Joseph et coll., 2015). Ce phénomène a été inhibé par la digoxine qui est connue pour avoir des effets modestes sur la synthèse protéique globale mais qui est capable d'inhiber d'une manière puissante la traduction des ARNm de HIF-1 α . Par cela, la digoxine supprime la TEM diminuant ainsi l'invasion. D'autre part, la surexpression de HIF-1 α dans différentes lignées de gliomes (U87MG, U373MG ou LN18) en conditions hypoxiques est capable d'induire une invasion cellulaire importante qui est corrélée à l'augmentation transcriptionnelle des métallo-protéases MMP2 et la diminution des inhibiteurs des métallo-protéases TIMP2 (Fujiwara et coll., 2007). Cette association entre l'induction de la migration/invasion induite par l'hypoxie dépendante de HIF-1 α et l'expression des métallo-protéases MMP2 est confirmée dans la lignée de gliomes U87 et démontrée dans les U251 par l'inhibition de cette migration HIF-1 α dépendante *via* par la mélatonine (Zhang et coll., 2013).

La sous-expression d'HIF-1 α qui réduit la migration cellulaire *in vitro* et l'invasion *in vivo* de plusieurs lignées de gliomes (humain LN308 et murin GL261) confirme ces résultats (Méndez et coll., 2010). Cette perte de migration/invasion est accompagnée par une diminution d'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Rad50, Rad21, Rad52, Trp53bp1), dans l'adhésion cellulaire (Coll17a1, Twist1) et dans la migration cellulaire (Ephb3, Kitl, Erbb2) (Méndez et coll., 2010).

L'ensemble de ces données suggèrent donc que l'hypoxie est capable d'induire une migration/invasion tumorale dépendante de HIF-1 α (Kalluri et Weinberg, 2009 ; Mani et coll., 2008). Ce phénomène peut conduire à un développement cellulaire non contrôlé, à une stimulation de l'angiogenèse et à une résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie. De ce fait, l'inhibition de ces mécanismes pourrait améliorer l'efficacité de la radiothérapie en affectant les mécanismes de migration des cellules tumorales et la formation des métastases (Biswas et coll., 2007 ; Park et coll., 2012).

2.2.2. La migration radio-induite

L'induction de HIF-1 α qui peut être activée par l'irradiation jouerait un rôle dans la radiorésistance des cellules cancéreuses (Huang et coll., 2011 ; Kessler et coll., 2010 ; Staab et coll., 2011 ; Ströfer et coll., 2011).

Suite à la radiothérapie, le niveau d'expression de HIF-1 α montre des fluctuations au cours du temps. Au début de la phase de ré-oxygénation induite par la radiothérapie, l'expression de HIF-1 α augmente à son maximum 24 à 48 heures post-RT. Cette augmentation s'expliquerait de la manière suivante : 1- l'irradiation provoquerait une augmentation de l'activité de HIF-1 α à cause de la formation excessive des ROS qui stabilisent et augmentent son activité durant la phase de ré-oxygénation radio-induite (Dewhirst et coll., 2008, Moeller et coll., 2004) et 2- pendant la ré-oxygénation, la dépolymérisation des granules de stress (qui associent les protéines aux ARNm pendant le stress afin d'inhiber l'utilisation de l'énergie pour la traduction des protéines) et la production des ROS augmentent HIF-1 α d'une manière dose-dépendante de 24 h à 1 semaine (Gottschald et coll., 2010; Kedersha et coll., 1999; Moeller et Dewhirst, 2004). Six ou sept jours après la radiothérapie, la stabilisation tardive de HIF-1 α observée correspond à la phase de production de monoxyde d'azote liée à l'infiltration des macrophages. Ce mécanisme qui stabilise HIF-1 α est associé à la radiorésistance des cellules cancéreuses (Chi et coll., 2012 ; Li et coll., 2007). L'irradiation est aussi capable de réduire l'hydroxylation de HIF-1 α *via* la déstabilisation des prolyl-hydroxylases (PHD2) et la réduction de la demi-vie de la protéine pVHL ce qui conduit à la stabilisation de HIF-1 α (Kim et coll., 2014).

Plusieurs études réalisées *in vitro* montrent le lien direct qui existe entre HIF-1 α et la radiorésistance, aussi bien en normoxie qu'en hypoxie (Huang et coll., 2011 ; Kessler et coll., 2010 ; Staab et coll., 2011 ; Ströfer et coll., 2011). Par exemple, Vordermark et coll., ont montré *in vitro* à l'aide de lignées tumorales de fibrosarcome et de carcinome que l'accumulation d'HIF-1 α en hypoxie pouvait favoriser leur radiorésistance (Vordermark et coll., 2004). Au contraire, l'inhibition d'HIF-1 α par siARN dans des cellules cancéreuses du colon augmente *in vitro* l'apoptose des cellules en condition hypoxique. De la même manière, l'atténuation de l'expression d'HIF-1 α dans des cellules tumorales, que ce soit avec ou sans irradiation, inhibe la croissance tumorale lorsque que ces cellules sont greffées en sous-cutané (Zhang et coll., 2004).

Une unique étude réalisée sur des lignées cellulaires de gliomes (U87 et U373) montre l'implication de HIF-1 α dans la migration radio-induite des cellules de gliomes (Kim et coll., 2014). Cette étude montre qu'une irradiation fractionnée (2 Gy x 3, sur 3 jours) augmente la migration et l'invasion des cellules U87 de manière significativement plus importante qu'une irradiation unique (à 2 ou 6 Gy). Cette invasivité accrue des U87 radio-induite est corrélée à la transformation mésenchymateuse mise en évidence par l'augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux tels que la N-Cadherine, la Vimentine, la fibronectine et de son régulateur Snail. Par Western blot, les auteurs ont montré que le niveau protéique d'HIF-1 α est significativement augmenté après l'irradiation fractionnée (2 Gy x 3) ou unique (6 Gy), et que cette hausse est reliée l'augmentation de sa demi-vie, sans toutefois mettre en évidence une accumulation d'HIF-1 α dans des cellules irradiées à 2 Gy.

Cette stabilisation d'HIF-1 α implique l'activation de la MAPK p38 et dans une moindre mesure la MAPK ERK précédemment montrée comme impliquée dans l'invasion radio-induite des cellules de gliome (Velpula et coll., 2012, Park et coll., 2012, Sofia Vala et coll., 2010). La voie MAPK p38 permet la stabilisation de HIF-1 α *via* la déstabilisation de pVHL et PHD2, qui en normoxie sont nécessaires à la dégradation d'HIF-1 α (Kim et coll., 2014). Au total, ces résultats obtenus *in vitro* principalement dans la lignée de glioblastome U87 montrent que l'irradiation est capable de stimuler la migration et l'invasion cellulaire de manière HIF-1 α dépendante. Jusqu'à présent, mise à part cette étude, l'effet de l'irradiation sur des cellules de gliomes en relation avec HIF-1 α n'a pas été exploré en détails. De manière encore plus surprenante, aucune étude n'a cherché à évaluer l'influence des rayonnements ionisants sur la migration et l'invasion des cellules souches de glioblastome. Connaissant leur radiorésistance accrue, il est important de savoir : 1- si le comportement dynamique des CSG peut être altéré après irradiation et 2- si c'est le cas, quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus.

Objectifs de thèse

Depuis sa découverte, le marqueur universel de l'hypoxie, le facteur de transcription HIF-1 α suscite de nombreux intérêts tant du point de vue fondamental que thérapeutique en raison de ses nombreux rôles critiques mis en évidence dans une multitude de processus à la fois développementaux, physiologiques et physiopathologiques (Semenza et coll., 2003 ; Wang et Semenza, 1996).

Le premier objectif de ma thèse a été de mieux comprendre quel pouvait être le rôle de HIF-1 α dans le développement normal du cortex embryonnaire. Pour ce faire, j'ai développé un modèle de souris transgénique déficient pour HIF-1 α spécifiquement au niveau des cellules de la glie radiaire afin d'évaluer les conséquences de cette déficience au cours de la neurogenèse. Ce travail a pu mettre en évidence que HIF-1 α joue un rôle déterminant dans la neurogenèse embryonnaire.

En parallèle à ce travail, j'ai participé à la caractérisation d'une nouvelle voie moléculaire dépendante de HIF-1 α responsable de réguler positivement et spécifiquement la migration radio-induite des cellules souches de gliomes humaines. La mise en évidence de cette nouvelle voie impliquant HIF-1 α et JMY dans les cellules souches de glioblastome pourrait contribuer à terme à améliorer l'efficacité des traitements du gliome par l'inhibition des mécanismes moléculaires stimulant la migration des CSG au cours de la radiothérapie.

RESULTATS ET DISCUSSION

HIF-1 α DANS LA NEUROGENESE EMBRYONNAIRE

I. Introduction

Les processus cellulaires mis en œuvre au cours de la neurogenèse embryonnaire sont strictement régulés par de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques délivrés avec une séquence temporelle stricte. Au cours du développement du cortex embryonnaire, les cellules de la glie radiaires (GR) situées dans la zone ventriculaire (ZV) constituent le pool majoritaire de cellules progénitrices (Hartfuss et coll., 2001). Elles sont considérées comme les cellules souches neurales (CSN) puisqu'elles ont la capacité à la fois de s'auto-renouveler et de générer des cellules capables de se différencier. Par division asymétrique, les GR sont capables de s'auto-renouveler et de produire soit des neurones corticaux directement ou des progéniteurs intermédiaires qui migrent dans la zone sous-ventriculaire et génèrent deux neurones par division symétrique. Parmi les facteurs ayant la capacité d'influencer ces processus, le niveau d'oxygène joue un rôle important notamment sur les CSN qui résident habituellement dans des niches hypoxiques dans le cerveau embryonnaire. Il a été rapporté à plusieurs reprises que la tension de l'oxygène influence les propriétés des CSN pendant le développement normal du cerveau. Son rôle serait particulièrement important dans l'équilibre entre la maintenance des CSN et la différenciation des cellules progénitrices neurales (Chen et coll., 1999 ; Studer et coll., 2000, Mohyeldin et coll., 2010 ; Simon et Keith, 2008). D'un autre côté, il est bien décrit dans la littérature que la diminution du niveau d'oxygène induit des réponses adaptatives au niveau cellulaire entraînant l'expression d'une large gamme de gènes cibles. Beaucoup de ces gènes associés à l'adaptation hypoxique sont régulés par le principal activateur transcriptionnel HIF-1 α , un membre de la famille hélice-boucle-hélice PAS (PER-ARNT-SIM) dont la stabilisation au niveau cellulaire est dépendante de l'oxygène. En normoxie, HIF-1 α est rapidement polyubiquitiné et dégradé par le protéasome tandis qu'en condition hypoxique, la sous-unité HIF-1 α s'accumule dans le cytoplasme, se transloque dans le noyau, se dimérise avec HIF-1 β puis se lie aux domaines HRE retrouvés dans le promoteur d'un grand nombre de gènes impliqués dans le transport du glucose, l'érythropoïèse, la glycolyse, l'angiogenèse et la survie cellulaire (Hofer et coll., 2002 ; Semenza 1999; Semenza, 2006 ; Ke et Costa 2006).

HIF-1 α est un facteur de croissance essentiel au développement précoce de nombreux organes. Ainsi, son inactivation complète entraîne de nombreuses malformations cardiaques et vasculaires provoquant rapidement une létalité chez la souris à un stade précoce de développement E10.5 (Iyer et coll., 1998 ; Kotch et coll., 1999). De ce fait, son implication au niveau des GR dans le développement

du cortex cérébral embryonnaire n'était pas envisageable dans les modèles déficients pour HIF-1 α déjà décrits.

Dans ce but, j'ai développé un modèle de souris knockout conditionnel inductible spécifiquement dans les GR reposant sur le système Cre/LoxP (Glast-YFP-CreERT2; HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ ou HIF-1 α CKO) afin de mieux comprendre le rôle de HIF-1 α dans le développement embryonnaire du système nerveux central. Ce modèle a été validé par la détection du marqueur de recombinaison YFP à partir de 24 heures après gavage (E16,5 et E14) aussi bien dans les témoins (Glast^{Cre/+} HIF-1 $\alpha^{+/+}$, souris Ctrl) que chez les souris déficientes pour Hif-1 α (Glast^{Cre/+} HIF-1 $\alpha^{\Delta/\Delta}$, souris CKO). Nous avons retrouvé une diminution significative de l'expression des ARNm codant pour HIF-1 α dans les cellules Glast^{Cre/+} HIF-1 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ par rapport aux cellules témoins. Ce modèle transgénique déficient pour HIF-1 α spécifiquement au niveau des GR nous a permis de démontrer que HIF-1 α représente un acteur essentiel de la neurogenèse embryonnaire.

II. Matériels et méthodes

1. Souris

Les souris floxées sur l'exon 2 de HIF-1 α (souche B6.129- HIF-1 α tm3Rsjo / J laboratoire de Jackson) sont croisées avec des souris Glast-CreERT2/ R26R-YFP (Ferent et coll., 2014) pour générer des souris Glast-CreERT2/R26R-YFP/HIF-1 α ^{flox / flox} (HIF-1 α CKO). Les souris HIF-1 α CKO sont comparées aux souris témoins Glast-CreERT2/R26R-YFP (HIF-1 α WT). L'ADN de la queue de souris est utilisé pour le génotypage par PCR. Les séquences d'amorces utilisées pour le génotypage GLAST-CreERT2 étaient GLAST F8 (5'-GAGGCACTTGGCTAGGCTCTGAGGA-3'), GLAST R3 (5'-GAGGAGATCCTGACCGATCAGTTGG-3') et CER1 (5'-GGTGTACGGTCAGTAAATTGGACAT-3') pour amplifier un produit de 700 pb pour l'allèle sauvage et un produit de 400 pb pour le transgène Cre. L'insertion de YFP est déterminée en utilisant 3 amorces: R1 (5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'), R2 (5'-GCGAAGAGTTTGTCTCAACC-3') et R3 (5'-GCGAAGAGTTTGTCTCAACC-3') pour amplifier un produit de 314 pb pour détecter l'insertion de YFP. L'amorce directe 5'-GGTGCTGGTGTCCAAAATGT-3' et l'amorce inverse 5'-TGTCCTTGCTGAGTGACAAGTGGAA-3' permettent de détecter un produit de 345 pb pour l'exon 2 floxé et un produit de 295 pb pour l'allèle sauvage de HIF-1 α (figure 1A). Tous les animaux inclus dans cette étude étaient hétérozygotes pour la Cre (Cre /+) et homozygotes pour l'insertion de YFP (YFP^{+/+}) et le floxage de HIF-1 α . Les expériences sont réalisées conformément à la directive du Conseil des Communautés européennes (86/609/ECC) et sont approuvées par le comité d'éthique de notre institut (A18_017).

2. Administration du Tamoxifène

Le tamoxifène (Sigma, T5648) est dissous dans de l'huile de maïs (Sigma, C8267) à 37 ° C pendant plusieurs heures à 20 mg/ml. Pour l'induction embryonnaire de l'activité Cre, 3 mg de tamoxifène sont administrés par gavage oral de femellesn gestantes (E12.5 ou E14.5). La délétion de l'exon 2 de HIF-1 α est confirmée par PCR sur des cellules isolées de la ZSV et triées le critère YFP+.

3. Injection intrapéritonéale de Brdu

Les injections intrapéritonéales (IP) de 200 µl d'une solution de BrdU à 5 mg diluée dans du PBS, refB5002, Sigma) sont effectuées deux heures avant le sacrifice (Roque et coll., 2012, Etienne et coll., 2014).

4. Immunofluorescence

Deux jours après le gavage oral de la femelle gestante, les cerveaux d'embryons sont prélevés et fixés pendant une nuit à 4 ° C par immersion dans du 4% paraformaldéhyde. Les échantillons sont transférés dans du PBS puis traités pour inclusion dans la paraffine en utilisant un processeur Tissue-Tek (VIP, Leica). Les coupes coronales (5 µm) ont été obtenues avec le microtome RM 2125 RT Leica et montées sur des lames de verre revêtues de polylysine. Les coupes de cerveaux sont dé-paraffinisées, démasquées dans une solution de citrate (pH 6) et incubées dans du PBS additionné de 7,5% de sérum de chèvre et de 7,5% de sérum de veau foetal pendant 1 heure à température ambiante. Pour l'immunfluorescence, les lames sont incubées pendant la nuit avec les anticorps primaires à 4 ° C. Les anticorps primaires utilisés dans cette étude sont: anti-GFP (1/200^e, poulet, réf Ab13970, Abcam), anti-GLAST (ACSA-1) (souris, 1/50^e, réf 130-095-822, Miltenyi), anti-BrdU (1/300^e, souris, réf RPN20Ab, GE Healthcare), anti-caspase-3 clivée (1/200^e, lapin, référence 9661S; signalisation cellulaire), anti-Sox2 (1/200^e, lapin, réf. D1C7J, signalisation cellulaire et souris, réf. 4900, Cell Signaling), anti-Pax6 (1/200^e, lapin, réf. D3A9V, signalisation cellulaire), anti-Tbr2 (1/200^e, lapin, réf ab23345, Abcam), anti-Tbr1 (1/100^e, lapin, réf. Ab31940; Abcam), anti-phospho-histone H3 (Ser10) (1/400^e, souris, réf. 9706; signalisation cellulaire). La contre-coloration nucléaire est réalisée par incubation avec du 4', 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Les lames sont finalement montées en Fluoromount (Southern Biotechnologies Associates) et les acquisitions ont été effectuées avec des filtres d'excitation et d'émission adaptées au fluorochrome utilisé sur un microscope (pathfinder) permettant de faire des acquisitions en mosaïque ou avec un microscope à fluorescence (Olympus BX51). Les images sont ensuite empilées avec le logiciel Photoshop (Adobe, San Jose, Californie, États-Unis) et utilisées pour mesurer les cellules marquées.

5. Mesure de l'épaisseur corticale

Les coupes corticales sont analysées dans un secteur standard de la paroi cérébrale dorso-médiale. L'épaisseur totale du cortex cérébral est déterminée en utilisant des coupes de cerveau coronales contre-colorées au DAPI (coupes de paraffine de 5 µm). Les mesures des deux hémisphères de chaque embryon sont effectuées en utilisant des coupes à des positions antéro-postérieures identiques. Un minimum de trois embryons provenant de trois portées différentes de chaque génotype a été analysé.

6. Quantification des cellules mitotiques et apoptotiques

Les figures mitotiques localisées dans les parois cérébrales dorso-médiales sont comptées par rapport à leur emplacement: apicale (mitose au bord du ventricule) ou basale (mitose dans les couches profondes du cortex). Les comptages du nombre de mitoses sont obtenus à partir des hémisphères droit et gauche de deux sections de chaque cerveau pour trois cerveaux embryonnaires provenant de trois portées différentes pour le même génotype. La longueur de chaque secteur analysé est mesurée et les résultats ont été exprimés en nombre de noyaux Phospho Histone H3 positif/360 µm de longueur. L'observation des cellules apoptotiques est réalisée par immunomarquage contre la caspase-3 clivée et par la détection des noyaux pycnotiques (Nowak et coll., 2006).

7. Orientation du fuseau mitotique des mitoses apicales

L'orientation du fuseau des cellules subissant une mitose apicale est quantifiée comme décrit précédemment en utilisant une macro spécialement développée dans le logiciel ImageJ (Godin et coll., 2010, Etienne et coll., 2012). L'orientation des chromatides sœurs est d'abord définie en traçant une ligne reliant le haut et le bas de chaque chromatide. Le plan de clivage a été défini comme la ligne bissectrice des deux lignes d'orientation des chromatides. Le plan de la surface apicale est déterminé comme une ligne tangente à la zone ventriculaire et l'angle entre le plan de clivage et la mesure de la surface apicale.

8. Quantification des marqueurs cellulaires

La quantification des cellules BrdU⁺, Sox2⁺, Pax6⁺, Tbr2⁺ et Tbr1⁺ sur les coupes de cerveaux est réalisée en utilisant une grille sur la paroi cérébrale dorsomédiale. La grille d'analyse est d'une longueur de 100 µm et est divisée en 36 secteurs (bin) de 10 µm de hauteur dans sa dimension radiale. Le premier bin est aligné avec son grand axe parallèle à la bordure ventriculaire. Le nombre de cellules marquées est compté dans chaque bin. Chaque zone comprenant la zone ventriculaire (ZV), la zone sous-ventriculaire (ZSV), la zone intermédiaire (ZI) ou la plaque corticale (PC) sont délimitées respectivement par immunomarquage dirigé contre Sox2, Tbr2 et Tbr1 chez les souris sauvages. Deux coupes corticales différentes ont été analysées par embryon pour trois embryons provenant de trois portées différentes. Les mesures sont effectuées dans les deux hémisphères droit-gauche en utilisant des sections situées à des positions antéro-postérieures identiques.

9. Tri cellulaire

Les cortex embryonnaires dorsaux sont microdisséqués sous binoculaire puis dissociés par incubation pendant 10 minutes avec de la collagénase de type I (100 U / ml, technologies Life) et de la DNase (100 U / ml, Sigma) dans du PBS à 0,15 % de BSA. Le tissu est ensuite dissocié mécaniquement en suspension monocellulaire. Les agrégats sont retirés avec un filtre en nylon de 20 µm (BD Biosciences) et les cellules sont centrifugées à 300 g pendant 10 minutes à 4 ° C. Finalement, les cellules sont incubées pendant 20 minutes dans du PBS à 0,15 % de BSA avec un anti-GLAST-PE (ACSA-1) (souris, 1/50^e, référence 130-095-822, Miltenyi) et lavées une fois dans du PBS à 0,15 % de BSA. Immédiatement avant le tri cellulaire, du Hoechst 33258 est ajouté à une concentration finale de 1 µg/ml pour détecter les cellules mortes. Les cellules GLAST⁺/YFP⁺ sont ensuite isolées à l'aide d'un trieur de cellules INFLUX équipé d'une buse de 86 µm à 40 psi.

10. Isolement de l'ARN et qRT-PCR

Les cortex dorsaux embryonnaires disséqués ou les cellules GLAST⁺/YFP⁺ isolées par tri cellulaire obtenus à partir de souris témoins et du cortex de souris HIF-1α CKO de 16,5 jours de gestation sont lysées dans du tampon de lyse RLT. Les ARN totaux du tissu cortical sont isolés avec le

kit RNeasy Plus Mini (QIAGEN), tandis que le kit RNeasy Plus Micro (QIAGEN) est utilisé pour isoler les ARN des cellules triées conformément aux instructions du fabricant.

Les ARN totaux sont transcrits de manière inverse en ADNc en utilisant le mélange de transcription inverse (Applied Biosystems) avec des amorces spécifiques listées dans le tableau 1 (HIF-1 α /GLUT-1/VEGF/Sox2/Pax6/Tbr2/Ki67 (Sigma-Aldrich)). La q-PCR est réalisée sur un système de détection de séquence ABI PRISM 7900 en utilisant du SYBR Green pour RT-PCR. Les niveaux d'expression sont normalisés avec l'expression du gene rapporteur GUS.

Amorces	Séquences
HIF-1 α Exon 2-3	Forward : AACAGTCCATCTGTGCCTTCA Reverse : TTCTGGATGCCGGTGGTCTA
GLUT-1	Forward: GCAGCAGCCTGTGTACGCCA Reverse : TGAGGTGCAGGGTCCGTCGT
VEGF	Forward : AAGGACTGTTCTGTCAACGG Reverse : CTTGCAGATGTGACAAGCCA
Sox2	Forward : CGGAGTGGAAACTTTTGTC Reverse : CGCGGCCGGTATTTATAAT
Pax6	Forward: GCATGCAGAACAGTCACAGCGGA Reverse : AGTGGCCGCCCGTTGACAAA
Tbr2	Forward : ACCAAAACACGGATATCACCCAGCT Reverse : TGGGATGAATCGTAGTTGTCCCGGA
Ki67	Forward : AGCAAACCAGCTGCAGAAAT Reverse : CCCTTGGCTTAGGTTCACTG
Gus	Forward : CTCCTCACTGAACATGCGAGG Reverse : GCCACAGCTGAATAGCCAGTT

III. Résultats expérimentaux

1. Mise au point de l'induction sélective de la perte d'expression de HIF-1 α dans les GR au cours du développement embryonnaire

1.1. Démarche expérimentale

Notre étude s'appuie sur le développement d'un modèle de souris knockout conditionnel inducible dans les CSN reposant sur le système Cre/LoxP.

Dans ce modèle :

- l'expression de la recombinaise Cre se trouve sous la dépendance du promoteur *Glast*, elle est exprimée constitutivement dans les GR *Glast*⁺ (Figure 1A ; Mori et coll., 2005)
- le traitement des animaux par du tamoxifène permet l'activation de la Cre,
- l'activation de la Cre est détectée grâce à l'excision par la recombinaise d'un codon stop floxé permettant l'expression de la protéine fluorescente YFP. Ce système permet de détecter les cellules recombinées par fluorescence (Figure 1A ; Ferent et coll., 2014).
- l'excision par la Cre de l'exon 2 du gène HIF-1 α grâce à la présence de séquences loxP entraîne la perte de l'expression d'une protéine HIF-1 α fonctionnelle dans les cellules *Glast*⁺ (Figure 1A).

Au cours de cette étude nous avons généré des souris témoins *Glast*^{Cre/+} HIF-1 α ^{+/+} dont le traitement par le tamoxifène induit des cellules YFP positives qui conservent l'expression de HIF-1 α et des souris *Glast*^{Cre/+} HIF-1 α ^{flox/flox} (CKO) qui génèrent après le traitement au tamoxifène des cellules YFP positives déficientes pour HIF-1 α (Figure 1).

1.2. Optimisation des recombinaisons au cours du développement embryonnaire

Dans le cerveau embryonnaire, le transporteur GLAST est exprimé par les cellules gliales radiaires situées dans les zones ventriculaires et qui émettent des longs prolongements cytoplasmiques de façon radiale. Les GR font fonction de cellules souches neurales en générant successivement des

neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes en fonction du stade de développement. Durant les stades de développement embryonnaire E11 à E17 de la souris, les GR génèrent, par des divisions asymétriques, des progéniteurs intermédiaires ou directement des neurones qui perdent l'expression de GLAST et migrent le long des fibres de la glie radiaire vers leur localisation terminale.

Dans le but d'optimiser l'activation de la Cre, nous avons testé différents protocoles de traitement par le Tamoxifène de femelles gestantes en faisant varier la dose, la voie d'administration de tamoxifène (gavage ou IP) et le stade de développement (puisque le niveau d'expression de GLAST par les CSN varie en fonction du stade de développement du cerveau). En accord avec le fait que dans la plupart des régions cérébrales, les GR constituent la majorité des progéniteurs à E13/E14 alors que pratiquement aucune GR n'est présente au stade E10/E11 (Gotz et coll., 2005), et que le niveau d'expression de GLAST est plus important à E14 dans le télencéphale dans des souris *Glast creERT2-YFP* (Mori et coll., 2005), le protocole optimal retenu à consister en un gavage unique de la femelle gestante avec 3 mg de tamoxifène à E14,5. L'analyse des coupes de cerveaux montre que le marqueur de recombinaison YFP est détectable dès 24 heures pour atteindre un maximum en nombre de cellules 48 heures après gavage (E16,5) aussi bien dans les témoins (*Glast^{Cre/+} Hif1 α ^{+/+}*) que chez les souris CKO *Glast^{Cre/+} Hif1 α ^{Δ/Δ}* (Figure 1B).

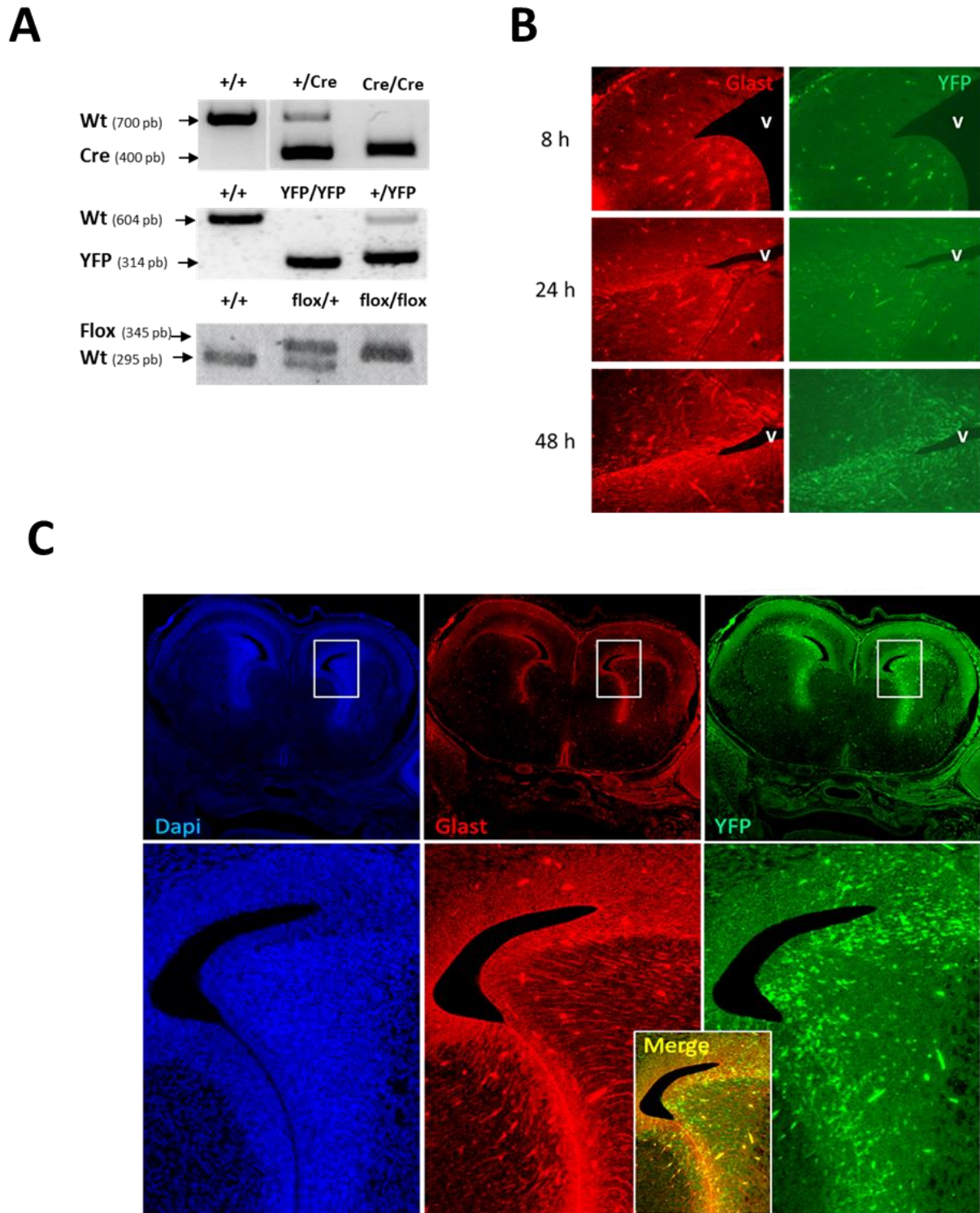


Figure 1 : Activation au cours du temps et localisation des cellules recombinées suivie par l'expression de l'YFP.

A, Exemple de génotypage par PCR pour la Cre, l'YFP et le flox de HIF-1 α .

B, Immunomarquages dirigés contre GLAST (rouge) et YFP (vert) sur des coupes de cerveaux embryonnaires de souris témoins HIF-1 α ^{+/+} et CKO au niveau de la région du EGL et de la frontière corticostriatiale à 8, 24 et 48 heures post-gavage.

C, Immunomarquages dirigés contre GLAST (rouge) et YFP (vert) sur des coupes de cerveaux embryonnaires d'une souris CKO 48 heures post-gavage. Les cellules sont contre colorées au DAPI (bleu).

1.3. Localisation des cellules YFP positives sauvages et floxées après traitement au tamoxifène

Quarante-huit heures après le traitement (E16, 5), les cellules recombinées (YFP positives) sont principalement retrouvées au bord des éminences ganglionnaires (EGL) et à la frontière cortico-striatales dans les zones dans lesquelles les CSN sont normalement situées (Figure 1B et 1C). Dans notre modèle, les cellules filles des cellules recombinées conservent l'expression de l'YFP, même si elles cessent d'exprimer GLAST en se différenciant. Le marquage par immunofluorescence de coupes de cerveaux a permis de démontrer que la plupart des cellules YFP coexpriment encore GLAST 48 heures après traitement aussi bien chez les souris HIF-1 α CKO que chez les animaux témoins (Figure 1B et 1C).

Une expression de l'YFP est également retrouvée dans une moindre mesure (tant du point de vue intensité que du nombre de cellules YFP positives) au niveau de la zone corticale (Figure 2A). Quarante-huit heures après l'injection de tamoxifène, le pourcentage de cellules ayant recombinées dans cette zone est de l'ordre de 15 % des cellules corticales sans que soit retrouvée une différence d'activation significative entre les souris témoins et les souris CKO (Figure 2B). La majorité des cellules recombinées se situent au niveau des zones ventriculaire et sous-ventriculaire dans des proportions similaires dans les animaux témoins et HIF1- α CKO (Figure 2A et 2C).

De manière intéressante, nous avons retrouvé dans les souris témoins et CKO la présence de quelques cellules YFP positives localisées dans la zone intermédiaire (ZI), zone où habituellement sont retrouvées des cellules différenciées. Ces cellules, qui ont perdu l'expression de GLAST mais qui ont subi une recombinaison puisqu'elles expriment la YFP semblent s'être différenciées en migrant dans la ZI. Ces cellules YFP positives différenciées sont retrouvées aussi bien chez les animaux témoins que chez les souris HIF-1 α floxées ($Glast^{Cre/+} Hif1\alpha^{\Delta/\Delta}$) suggérant que la perte de HIF-1 α (voir chapitre 1.4., Figure 2D) n'empêche pas la différenciation des CSN qui sont retrouvées dans la zone intermédiaire.

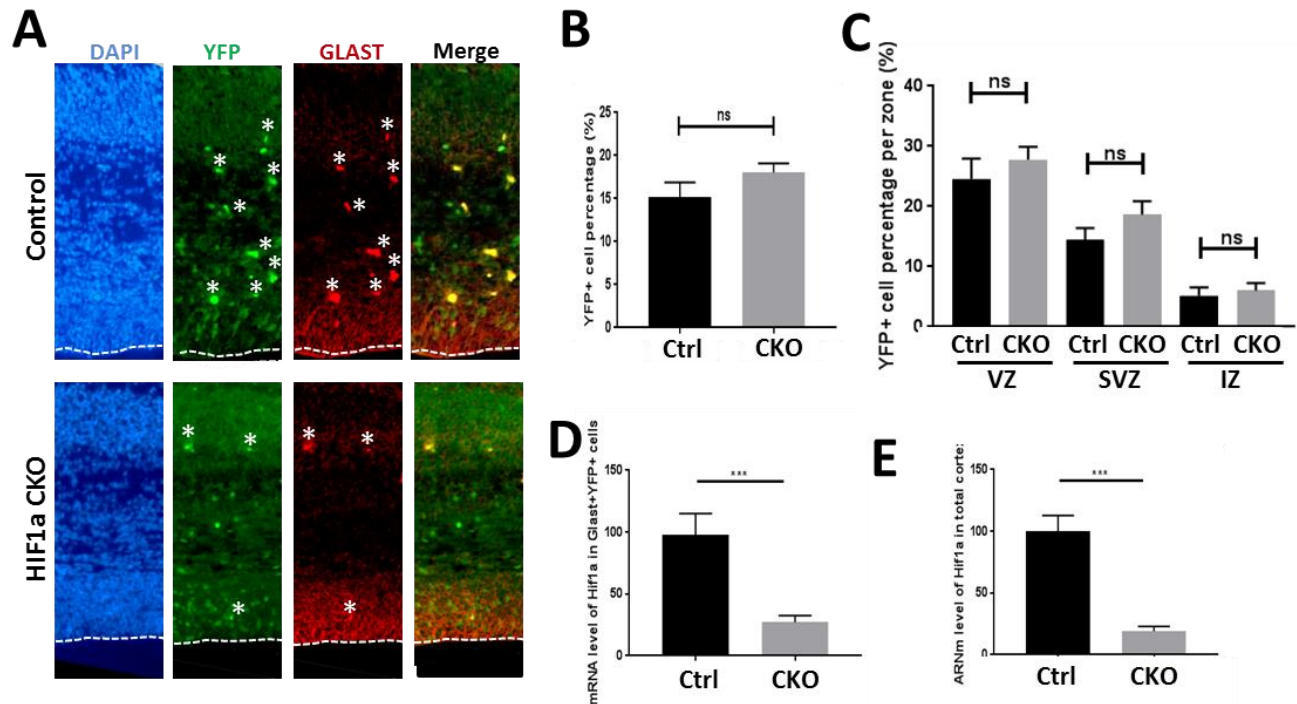


Figure 2: Localisation corticale des cellules recombinées YFP⁺ et validation de l'inhibition de HIF-1 α .

A, Localisation des cellules recombinées YFP au niveau des couches corticales. La ligne pointillée représente le bord du ventricule. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins auto-fluorescents.

B et C, Pourcentage d'activation de recombinaison estimé par le nombre de cellules YFP⁺ retrouvées au niveau du cortex (B) et au niveau de la ZV, ZSV et ZI (C) chez les souris témoins et CKO.

D et E, Comparaison du niveau d'ARNm codant pour HIF-1 α dans des cellules Glast⁺YFP⁺ préalablement triées par cytométrie en flux (D) et sur les cellules corticales (E) provenant d'animaux témoins et CKO.

1.4. Validation de l'inhibition de HIF-1 α dans les CSN

Nous avons mesuré les ARNm codant pour HIF-1 α au niveau de l'exon ciblé par la recombinaison (exon 2) par RT-qPCR dans les cellules préalablement triées par cytométrie en flux sur les critères YFP positif et Glast positif (Glast⁺YFP⁺). Les résultats montrent que l'expression de la Cre entraîne une diminution significative de l'expression de HIF-1 α dans les cellules Glast^{Cre/+}Hif1 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ par rapport aux cellules témoins (Figure 2D, ***p<0.001). Ces résultats suggèrent donc que deux jours après traitement au tamoxifène, nous sommes capables d'inhiber de manière significative le niveau d'expression de HIF-1 α dans 15% des CGR au stade E16.5 de développement.

De manière surprenante, alors que la majorité des cellules corticales sont toujours efficaces pour HIF-1 α deux jours après le traitement au tamoxifène, l'analyse du niveau des ARNm codant pour HIF-1 α provenant du feuillet cortical d'animaux CKO montre que la déficience de HIF-1 α retrouvée dans 15 % des cellules corticales est suffisante pour diminuer significativement le niveau des ARNm

codant pour HIF-1 α dans l'ensemble des cellules corticales. Ces données suggèrent que la déficience spécifique en HIF-1 α dans les cellules GLAST-positives obtenues en deux jours induit un déclin rapide et général de l'expression de HIF-1 α dans l'ensemble du cortex embryonnaire (Figure 2E, ***p<0.001).

2. L'épaisseur corticale est significativement diminuée dans les cerveaux d'embryons CKO

Nous avons ensuite analysé l'épaisseur du néocortex E16.5 sur des coupes coronales colorées au DAPI provenant de souris traitées au tamoxifène deux jours avant leur sacrifice. De manière intéressante, nous avons montré qu'un déficit en HIF-1 α était capable d'induire une réduction significative de l'épaisseur du cortex (Figure 3A et 3B). En effet, le néocortex des cerveaux des souris HIF-1 α CKO est significativement plus mince que celui des souris témoins (Figure 3A et 3B). Cette réduction de taille a été observée à la fois dans les zones ventriculaire et sous-ventriculaire, et au niveau de la zone intermédiaire et de la plaque corticale (Figure 3C).

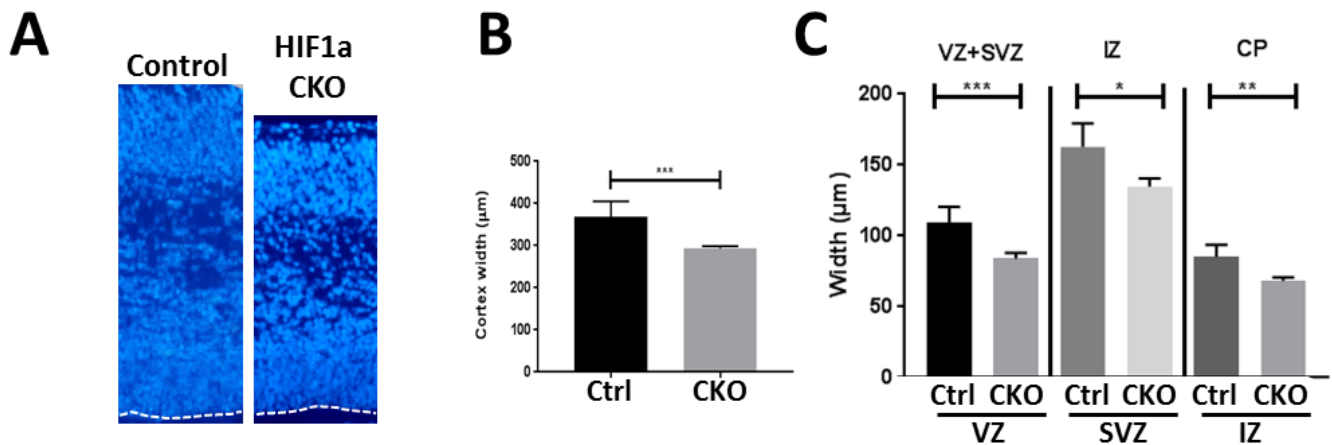


Figure 3: L'épaisseur de la plaque corticale est significativement diminuée dans les cerveaux embryonnaires CKO.
A, Coupe coronale de cortex embryonnaire au stade de développement E16.5 d'une souris témoin et CKO contre colorée au DAPI.
B et C, Epaisseur moyenne (en µm) du cortex (B) et de la ZV/ZSV, ZI et PC (C) de souris témoins et CKO.

3. La déficience en HIF-1 α altère l'expression du VEGF, du GLUT1 en relation avec une altération de la vascularisation embryonnaire

Parce que HIF-1 α a été décrit pour activer de nombreux gènes angiogéniques requis pour le développement vasculaire, nous avons déterminé les conséquences de sa perte fonctionnelle dans le cerveau embryonnaire CKO en examinant l'expression des facteurs angiogéniques hypoxiques VEGF et GLUT-1 bien connus pour être régulés par HIF-1 α (Ke et Costa, 2006). L'analyse qPCR révèle que les niveaux d'expression des ARNm codant pour VEGF et GLUT-1 dans les cellules triées GLAST⁺/YFP⁺ sont significativement réduits dans les cerveaux E16.5 CKO par rapport aux cerveaux témoins (Figure 4A et 4B). A l'instar de la perte d'expression de HIF-1 α dans le cortex embryonnaire entier, les expressions du VEGF et du GLUT1 sont également modifiées significativement dans le cortex embryonnaire (Figure 4C et 4D), suggérant que la déficience en HIF-1 α dans les cellules GLAST⁺ induit une diminution globale et rapide des gènes codant pour des facteurs de croissance angiogéniques au niveau du cortex embryonnaire.

Pour déterminer si l'absence d'expression de HIF-1 α dans les CSN GLAST⁺ influence la stabilité vasculaire du cortex embryonnaire, nous avons ensuite quantifié la vascularisation corticale au niveau du cortex à partir d'images obtenues par immunofluorescence et par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps dirigé contre la laminine. Comme le montre la Figure 4E, la densité des vaisseaux ainsi que leur longueur sont significativement diminuées dans les souris CKO par rapport aux souris témoins deux jours après l'administration de tamoxifène. Ces données suggèrent que l'inactivation du gène HIF-1 α dans les CSN GLAST⁺ affecte très rapidement et significativement la stabilité vasculaire de l'ensemble du cortex embryonnaire.

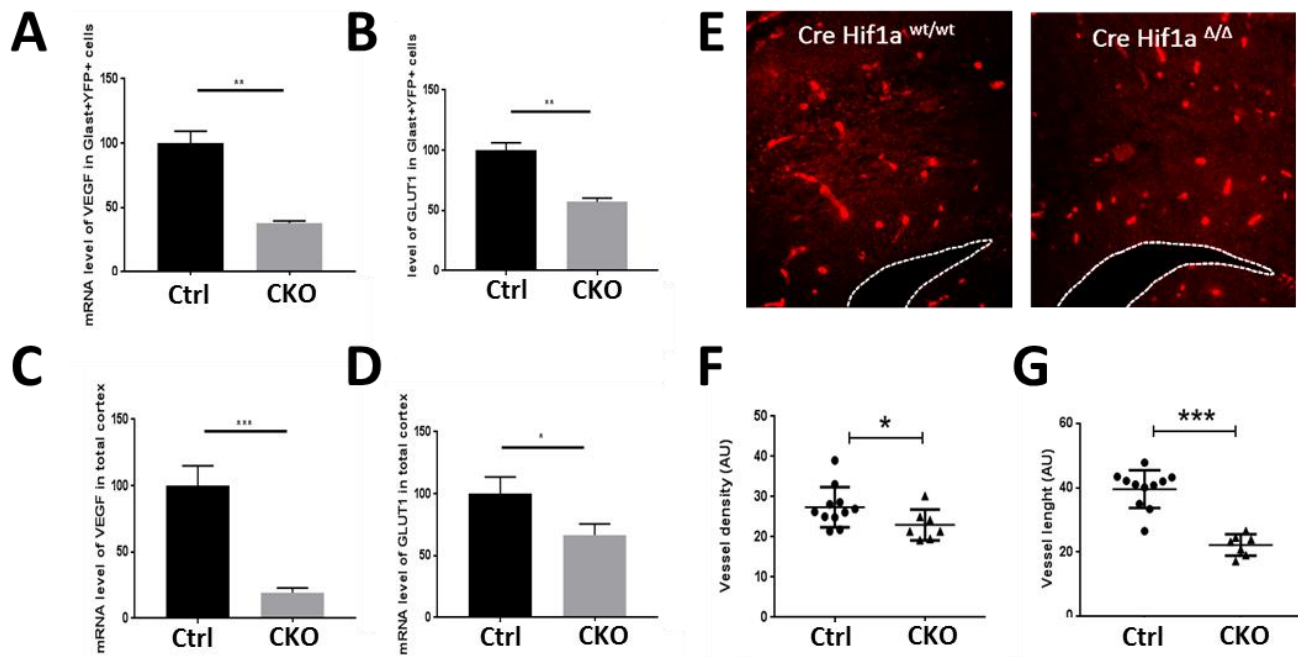


Figure 4: La perte de HIF-1 α altère l'expression du VEGF, de GLUT1 et de la vascularisation embryonnaire.

A à D, Niveau d'ARNm codant pour VEGF (A et C) et GLUT1 (B et D) dans les cellules Glast⁺YFP⁺ préalablement triées (A et B) et dans des cellules corticales (C et D).

E, Marquage immunofluorescent du réseau vasculaire à l'aide d'un anticorps dirigé contre la laminine sur un cerveau témoin et CKO. L'espace ventriculaire est délimité par une ligne pointillée blanche.

F et G, Quantification de la densité moyenne (F) et de la longueur moyenne (G) des vaisseaux détectés par un marquage laminine dans des cerveaux témoins et CKO.

4. Les cerveaux CKO HIF-1 α ne présentent pas d'apoptose spontanée détectable

La réduction de l'épaisseur du cortex que nous avons précédemment mis en évidence pourrait s'expliquer par l'activation d'une apoptose dans les souris CKO. C'est pourquoi nous avons examiné des coupes coronales du néocortex immunomarquées avec un anticorps dirigé contre la caspase-3 clivée. Quel que soit le site cortical examiné (ventriculaire, sous-ventriculaire, plaque intermédiaire et plaque corticale), nous sommes incapables de détecter un marquage positif à la Caspase-3 clivée que ce soit dans les cerveaux CKO ou dans les cerveaux témoins (Figure 5A) alors que de nombreuses cellules apoptotiques apparaissent clairement dans un cerveau embryonnaire témoin irradié (4 heures après une irradiation à la dose de 1Gy ; Figure 5B). De la même manière, le cortex embryonnaire des souris CKO ne présentent pas de noyaux pycnotiques, un autre marqueur d'apoptose dans le cerveau embryonnaire (Figure 5A ; Nowak et coll., 1999). Ces données suggèrent donc que la diminution de l'épaisseur corticale retrouvée chez les souris CKO n'est pas due à une augmentation des événements apoptotiques. Ces données démontrent également que la délétion de HIF-1 α n'altère pas la viabilité des cellules neurales à ce stade de développement et dans ces délais de traitement.

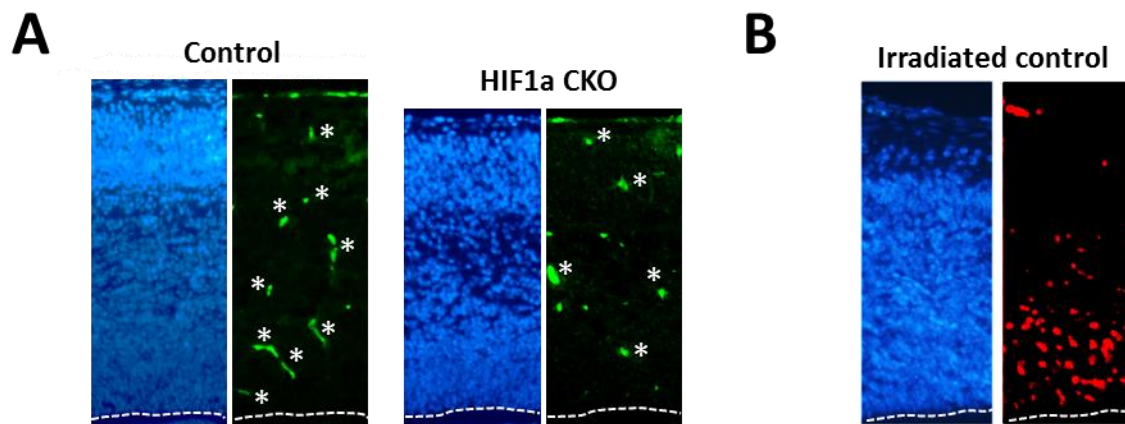


Figure 5: L'absence de HIF-1 α n'induit pas d'apoptose au niveau de la zone corticale de cerveaux CKO.

A, L'immunodétection des cellules apoptotiques par un marquage spécifiquement dirigé contre la caspase-3 clivée ne met pas en évidence de phénomènes apoptotiques aussi bien dans les cerveaux témoins que CKO. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins auto-fluorescents.

B, Quatre heures après une irradiation à 1 Gy, de nombreuses cellules caspase-3 positives sont retrouvées au niveau du cortex chez une souris témoin.

5. La déficience de HIF-1 α induit une diminution du nombre de mitoses

Puisqu' aucun événement apoptotique ne peut expliquer l'altération de l'épaisseur corticale observée dans le cerveau CKO, nous nous sommes intéressés à rechercher si des dysfonctionnements mitotiques pouvaient contribuer à cette réduction chez les embryons CKO. Pour cela nous avons déterminé le nombre de cellules mitotiques dans les cerveaux en développement des animaux témoins et CKO par immunofluorescence à partir des coupes coronales paraffinées à l'aide d'un anticorps spécifiquement dirigé contre la Phospho Histone H3 (Balhorn et coll., 1975; Gurley et coll.,1978). Dans notre analyse, nous distinguons les mitoses dites apicales situées à la frontière du ventricule et les mitoses basales situées à l'extérieur de la frontière du ventricule. De manière remarquable nous avons mis en évidence que les cerveaux embryonnaires CKO présentent une réduction significative de plus de 50% du nombre de mitoses apicales PH3-positives par rapport aux cerveaux témoins aussi bien dans la population générale que dans les cellules YFP⁺ ($9,3 \pm 0,9$ versus $3,9 \pm 0,7$ *** $p < 0,001$ et $2,5 \pm 0,5$ versus $0,6 \pm 0,1$ ** $p < 0,01$ respectivement ; Figure 6A, 6B, 6C). Une diminution similaire est observée au niveau des mitoses basales dans la population générale ($8,4 \pm 1,1$ versus $3,9 \pm 0,5$ ** $p < 0,01$; Figure 6E et 6F) et dans la population YFP⁺ ($6,7 \pm 1,2$ versus $2,8 \pm 0,6$ * $p < 0,05$, figure 6G). Au total, nos données indiquent que la déficience en HIF-1 α induit une altération mitotique générale aussi bien au niveau des progéniteurs apicaux que dans des progéniteurs intermédiaires. Cette altération mitotique

pourrait en partie expliquer la diminution significative de l'épaisseur du cortex retrouvée chez les animaux CKO (Figure 3).

Nous nous sommes également intéressés à évaluer l'angle mitotique des mitoses apicales. En effet, les cellules en cours de différenciation présentent principalement un angle mitotique horizontal alors que l'expansion des GR permettant l'amplification des cellules progénitrices est plutôt associée un angle mitotique vertical (Haydar et coll., 2003). Nos données montrent que l'angle moyen entre la plaque métaphasique et la surface ventriculaire, qui caractérisent l'orientation moyenne du plan de clivage mitotique de la GR est comparable chez les souris CKO HIF-1 α et les souris témoins ($70,5 \pm 20,7$ *versus* $74,3 \pm 13$ degrés, Figure 6D). Ces données suggèrent donc que la déficience en HIF-1 α n'a pas d'incidence sur la transition des GR du mode prolifératif au mode neurogénique.

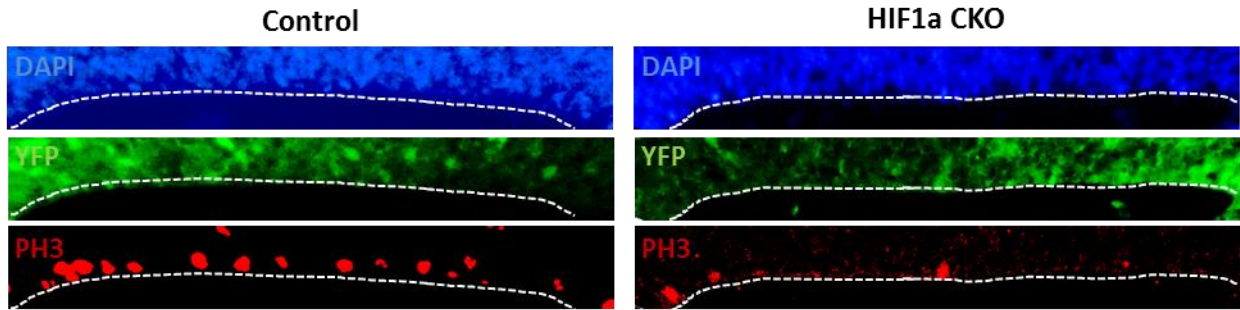
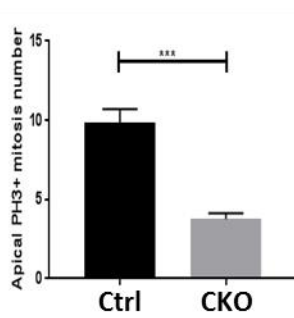
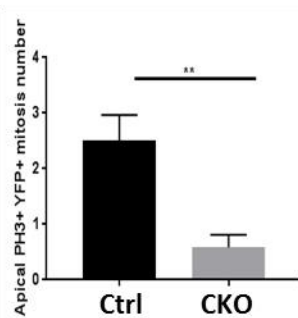
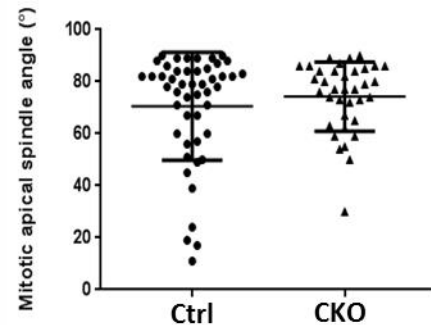
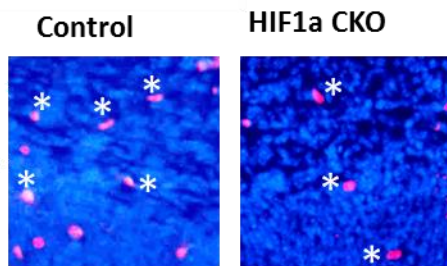
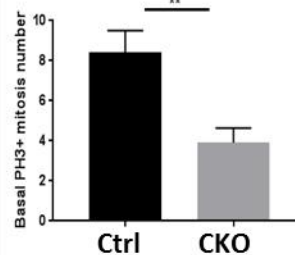
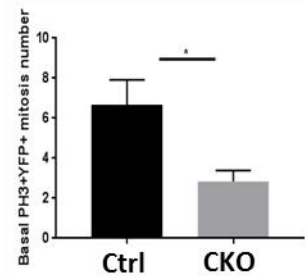
A**B****C****D****E****F****G**

Figure 6: La déficience de HIF-1 α induit une diminution du nombre de mitoses dans le cerveau en développement.

A, Marquage immunofluorescent dirigé contre la phospho-histone H3 (rouge) sur des coupes coronales de cerveaux témoins et CKO au niveau de la bordure du ventricule délimitée par une ligne blanche pointillée. Les cellules ayant recombinées expriment l'YFP. Les noyaux sont contre colorés en DAPI. La ligne pointillée représente le bord du ventricule.

B et C, Quantification du nombre de mitoses apicales PH3-positives (**B**) ou dans les cellules YFP⁺ (cellules ayant recombinées et déficientes pour HIF-1 α , **C**).

D, Répartition des angles mitotiques du plan de clivage des mitoses apicales mesurés à l'aide du logiciel ImageJ sur coupes coronales de cerveaux témoins et CKO.

E, Marquage immunofluorescent dirigé contre la phospho-histone H3 (rouge) sur des coupes coronales de cerveaux témoins et CKO au niveau de la zone basale du cortex. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins autofluorescents.

F et G, Quantification du nombre de mitoses basales PH3-positives (**F**) et dans les cellules YFP⁺ (**G**).

6. La déficience de HIF-1 α diminue la prolifération des progéniteurs

Afin d'estimer *in vivo* la prolifération cellulaire, nous avons évalué l'incorporation d'un analogue de la thymidine (BrdU) deux heures après son injection intra-péritonéale chez la femelle

gestante (E16,5). Cette expérience nous permet d'évaluer le nombre de cellules rentrant en phase S. L'analyse des noyaux BrdU⁺ révèle que la perte de HIF-1 α entraîne chez les embryons CKO une diminution significative de la prolifération des cellules à la fois dans la population ayant recombinée (YFP⁺, déficiente pour HIF-1 α ; Figure 7A et 7B; **p<0.01) que dans l'ensemble des cellules corticales (Figure 7A et 7C; ***p<0.001) par rapport au témoin embryon. Comme attendu, cette perte de prolifération cellulaire est principalement localisée dans la zone ventriculaire où est retrouvée la majorité des cellules en prolifération (Figure 7D). Cette altération de la prolifération cellulaire est associée à une diminution significative de 42 % de l'expression des ARNm codant pour Ki67 dans la population GLAST⁺/YFP⁺ (*p<0,05; Figure 7E). Ainsi, la diminution rapide de la prolifération cellulaire qui est associée à une diminution du nombre de mitoses chez les souris CKO renforce l'idée que ces altérations pourraient en partie être à l'origine de la diminution significative de l'épaisseur corticale observée chez les souris CKO.

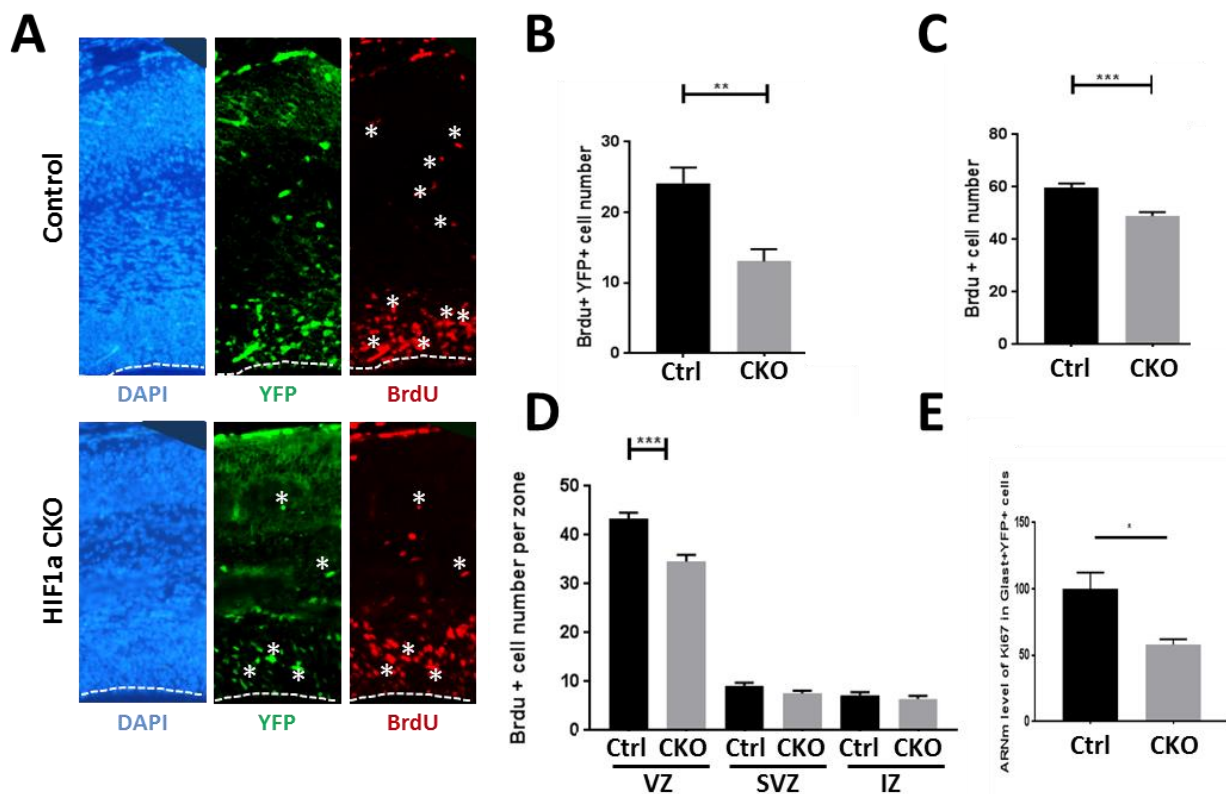


Figure 7: L'absence de HIF-1 α diminue la prolifération des progéniteurs.

A, Marquage immunofluorescent dirigé contre le BrdU (rouge) préalablement incorporé dans les cellules durant deux heures avant fixation des cerveaux. Les cellules ayant recombinées sont YFP⁺. La ligne pointillée représente le bord du ventricule. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins auto-fluorescents.

B et C, Quantification du nombre de cellules BrdU⁺YFP⁺ (B) et sur la totalité de la couche corticale de cerveaux témoins et CKO (C).

D, Nombre de cellules BrdU⁺ en fonction de leur localisation dans la ZV, ZSV et ZI.

E, Niveau d'ARNm codant pour Ki67 dans les cellules triées Glast⁺YFP⁺ à partir de cerveaux témoins et CKO.

7. La perte de HIF-1 α provoque une diminution des populations cellulaires Pax6⁺ et Sox2⁺

Nous avons ensuite évalué la conséquence de la perte de HIF-1 α dans les cellules GLAST⁺ dans deux populations prolifératives différentes : les cellules Pax6⁺ et les cellules Sox2⁺. La population Pax6⁺ est spécifique des cellules GR qui sont localisées en condition normale dans la zone ventriculaire du cortex embryonnaire (Haubensak et coll., 2004; Hutton et Pevny, 2011; Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009). Alors que Pax6 est utilisé comme marqueur des GR, Sox2 est considéré à la fois comme un marqueur des GR et des PI précoces (Graham et coll., 2003 ; Hutton et Pevny, 2011). Les immunomarquages et les comptages des populations cellulaires Pax6 et Sox2 ont été réalisés dans la zone dorsale de coupes coronales embryonnaires provenant d'embryons témoins et CKO au stade E16.5 jours de développement ayant reçu un traitement au tamoxifène à E14.5.

Nos analyses mettent en évidence que la perte de HIF-1 α dans les GR induit une diminution significative du nombre de cellules Pax6⁺YFP⁺ (Figure 8A et 8B, ***p<0.001) et dans la population Sox2⁺YFP⁺ (Figure 8E et 8F, ***p<0.001) dans les cerveaux déficients HIF-1 α CKO. Comme attendu, l'examen de leur localisation dans les différentes zones de néocortex (ZV, ZSV et ZI) montre que la perte des GR a principalement lieu dans la ZV (Figure 8C et 8G). En accord avec ces données d'immunofluorescence, les niveaux des ARNm codant pour Pax6 et Sox2 diminuent significativement dans le cerveau CKO par rapport au cerveau témoin (Figure 8D et 8H ; ***p<0.001). Au total, nos données suggèrent que le déficit en HIF-1 α altère la neurogenèse au niveau des GR.

8. La perte de HIF-1 α provoque une accumulation des progéniteurs intermédiaires Tbr2⁺

Nous avons poursuivi nos analyses en quantifiant le nombre de progéniteurs intermédiaires (PI) qui dérivent des GR et qui sont retrouvés en condition normale principalement au niveau dans la zone basale de la ZV et dans la ZSV (Bulfone et coll., 1999, Gal et coll., 2006, Kriegstein et coll., 2006, Miyata et coll., 2004). Contrairement au GR, notre analyse montre que les PI Tbr2⁺ sont plus nombreux dans les cerveaux CKO aussi bien dans la population ayant recombinaison (Tbr2⁺YFP⁺ ; Figure 9A et 9B, ***p<0.001) que dans la population générale de PI Tbr2⁺ (Figure 9A et 9E, **p<0.01). L'examen de leur localisation met en évidence que l'accumulation des PI Tbr2⁺ est principalement retrouvée dans la

ZV et la ZSV (Figure 9C et 9F). Il est par ailleurs intéressant de noter qu'une augmentation significative du nombre de PI Tbr2⁺ ayant recombines (Tbr2⁺YFP⁺ déficients pour HIF-1 α) est retrouvée dans la zone intermédiaire des cerveaux CKO par rapport aux souris témoins (Figure 9C).

L'augmentation significative du nombre de PI Tbr2⁺ est corrélée avec l'augmentation du niveau des ARNm codant pour Tbr2 retrouvée dans les cerveaux CKO en comparaison à celui mesuré dans des cerveaux témoins (Figure 9D et 9G).

9. Le nombre de neurones post-mitotiques Tbr1⁺ n'est pas modifié dans les animaux déficients pour HIF-1 α

Finalement, pour savoir si l'absence de HIF-1 α pouvait permettre l'accélération de la transition progéniteurs intermédiaires vers la formation de neurones post-mitotiques, nous avons investigué la population des neurones post-mitotiques exprimant le facteur de transcription Tbr1. Comme le montre la Figure 10A, nous retrouvons au niveau du cortex, des cellules Tbr1⁺ localisées dans la ZI qui présentent une faible expression de Tbr1 alors que les cellules situées au niveau de la plaque corticale expriment fortement Tbr1 en accord avec les données de la littérature (Englund et coll., 2005). L'analyse du nombre de cellules Tbr1⁺ localisées au niveau de la plaque corticale met en évidence qu'il n'y a pas de différence significative entre les animaux témoins et les CKO. Ceci suggère donc qu'à ce temps de 2 jours post-traitement, l'influence de la perte de HIF-1 α sur la transition PI vers neurones post-mitotiques n'est pas détectable.

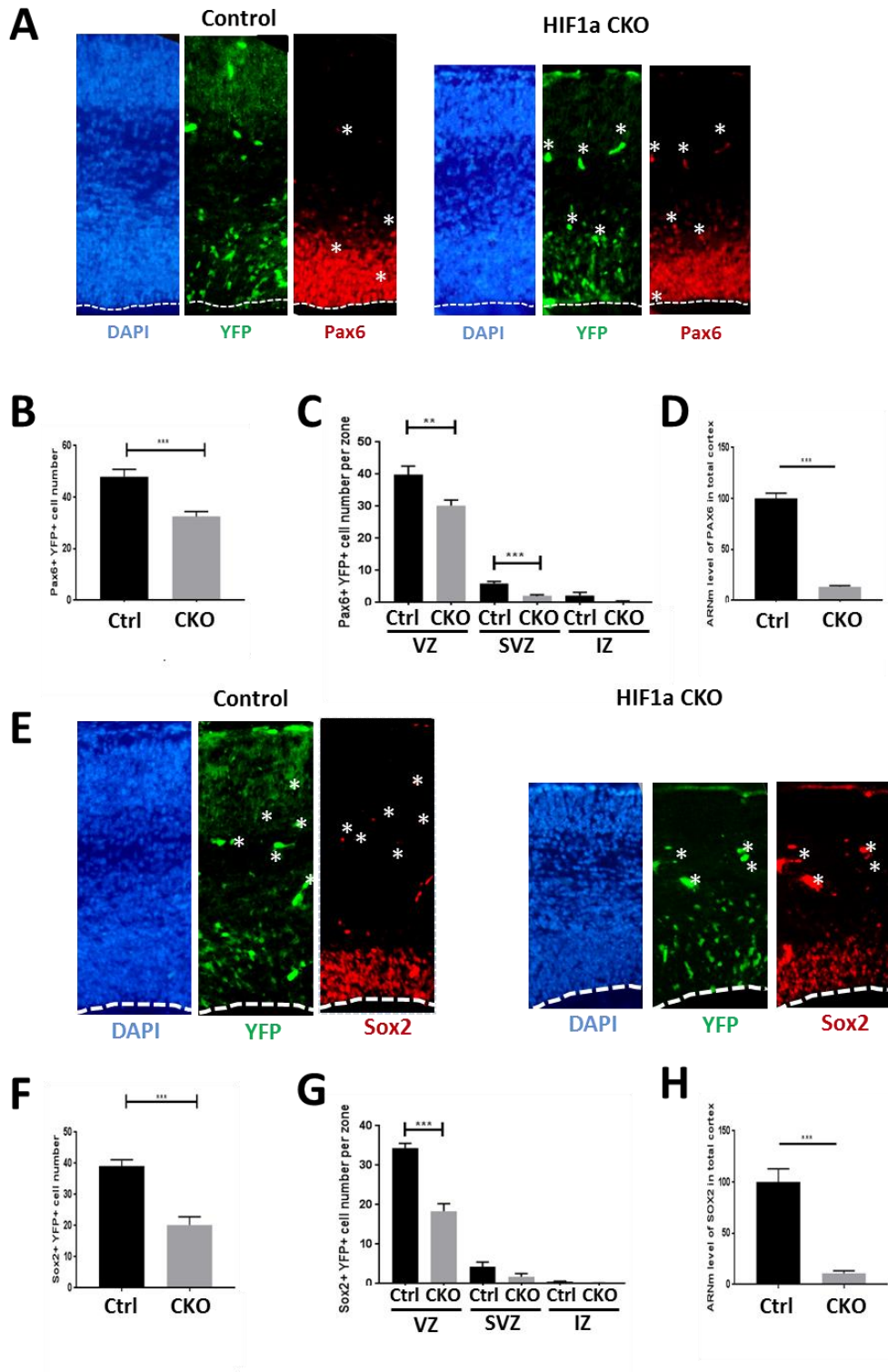


Figure 8: La perte de HIF-1 α provoque une diminution des GR.

A, Immunomarquage des GR Pax6⁺ sur des coupes coronales de cerveaux témoins et CKO. Les cellules ayant recombinées sont YFP⁺. Le bord du ventricule est délimité par une ligne blanche pointillée. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins auto-fluorescents.

B et C, Quantification du nombre de GR Pax6⁺YFP⁺ au niveau du cortex (**B**) et en fonction de leur localisation dans la ZV, ZSV et ZI (**C**).

D, Niveau d'ARNm codant pour Pax6 dans les cellules corticales.

E, Immunomarquage de Sox2 sur des coupes coronales de cerveaux témoins et CKO. Les cellules ayant recombinées sont YFP⁺. Le bord du ventricule délimité par une ligne blanche pointillée. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins auto-fluorescents.

F et G, Quantification du nombre totale des cellules Sox2⁺YFP⁺ (**F**) et en fonction de leur localisation dans la ZV, ZSV et ZI (**G**).

H, Niveau d'ARNm codant pour Sox2 dans les cellules corticales.

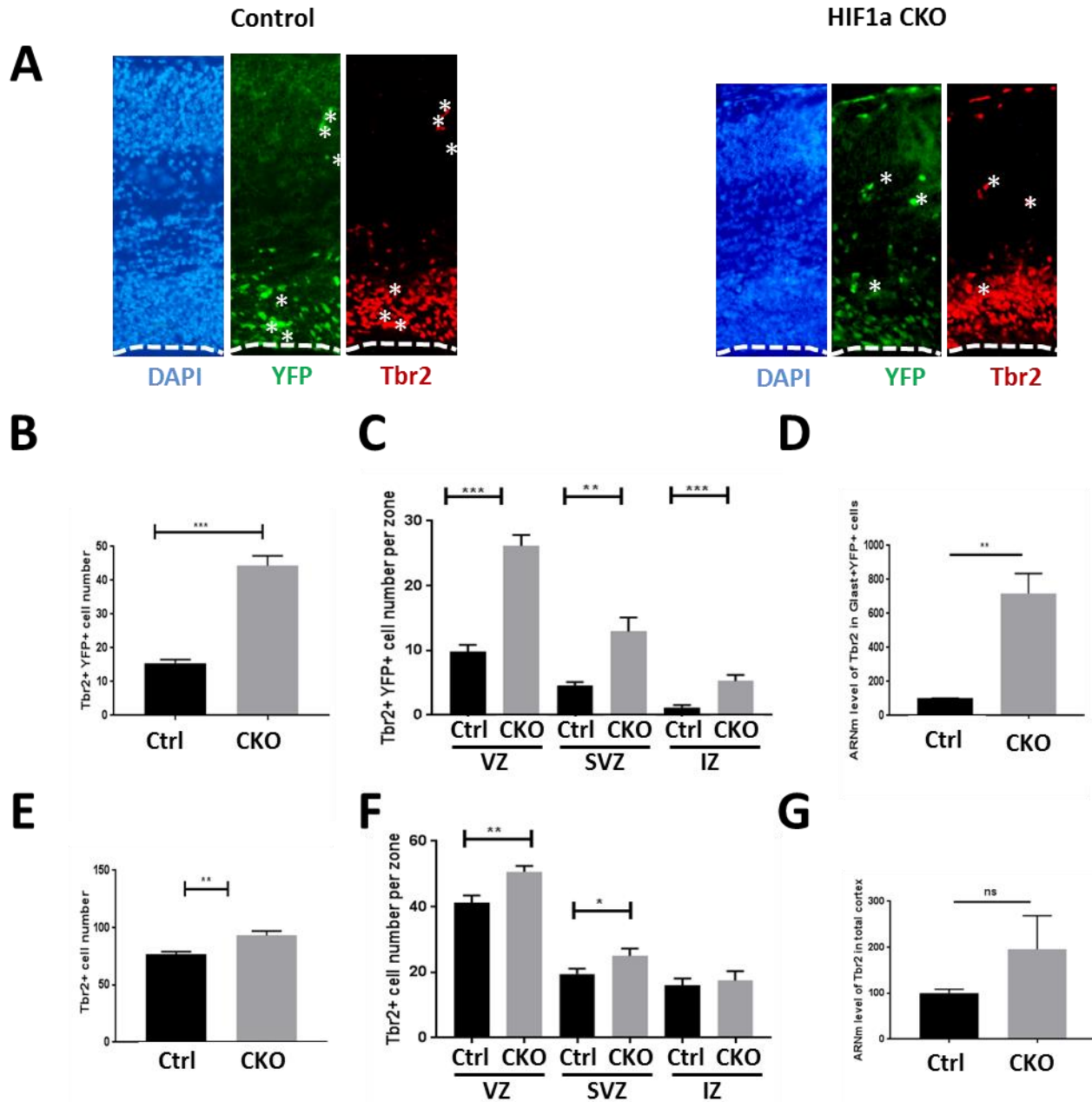


Figure 9: La perte de HIF-1 α provoque une accumulation des progéniteurs intermédiaires Tbr2⁺.

A, Immunomarquage des PI Tbr2⁺ sur des coupes coronales de cerveaux témoins et CKO. Les cellules ayant recombinées sont YFP⁺. Le bord du ventricule est délimité par une ligne blanche pointillée. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins auto-fluorescents.

B et C, Quantification du nombre de PI Tbr2⁺YFP⁺ au niveau du cortex (**B**) et en fonction de leur localisation dans la ZV, ZSV et ZI (**C**).

D, Niveau d'ARNm codant pour Pax6 dans les cellules triées Glast⁺YFP⁺.

E et F, Quantification du nombre de PI Tbr2⁺ (**E**) et en fonction de leur localisation dans la ZV, ZSV et ZI (**F**).

G, Niveau d'ARNm codant pour Pax6 dans les cellules corticales.

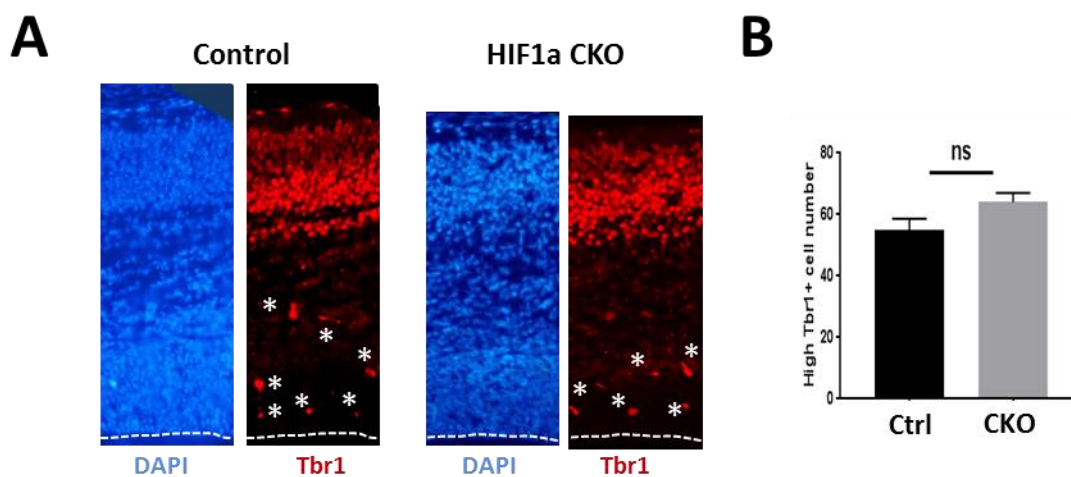


Figure 10: Le nombre de neurones post-mitotiques $Tbr1^+$ n'est pas modifié dans les animaux déficients pour HIF-1 α au stade E16.5 de développement.

A, Immunomarquage des neurones post-mitotiques $Tbr1^+$ sur des coupes coronales de cerveaux témoins et CKO. Les cellules ayant recombinées sont YFP^+ . Le bord du ventricule est délimité par une ligne blanche pointillée. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins auto-fluorescents.

B, Quantification du nombre de neurones post-mitotiques $Tbr1^+$ au niveau du cortex.

10. Les altérations provoquées par la perte de HIF-1 α à un stade de développement plus précoce (E14.5) sont comparables à celles décrites à 16.5

Dans le but de savoir si les conséquences de la perte de HIF-1 α pouvaient être liées au stade de développement, nous avons traité des femelles gestantes à E12.5 avec la même dose de tamoxifène que précédemment utilisée (3 mg, IP). Nous avons ensuite analysé les mêmes paramètres que ceux précédemment décrits chez les embryons traités au stade E14,5 de développement.

Conformément aux données de la littérature décrivant que l'expression de GLAST est plus faible à E12.5 qu'à E14.5, le nombre de cellules YFP^+ dans le cerveau E14.5 dont l'expression dépend de l'activation transcriptionnelle du promoteur GLAST est retrouvée inférieure à celle observée dans les cerveaux de E16.5 chez les embryons témoins ($4,3 \pm 0,7$ à E14.5 *versus* $15,1 \pm 2$ % à E16.5) et chez les embryons CKO ($6,7 \pm 1,1$ à E14.5 *versus* $18,0 \pm 1,0$ à E16.5).

Comme à E16.5, le pourcentage d'activation estimé par l'expression du YFP n'est pas significativement différente dans les cerveaux témoins et CKO E14.5 ($4,3 \pm 0,7$ % chez le témoin et $6,7 \pm 1,1$ % chez le CKO).

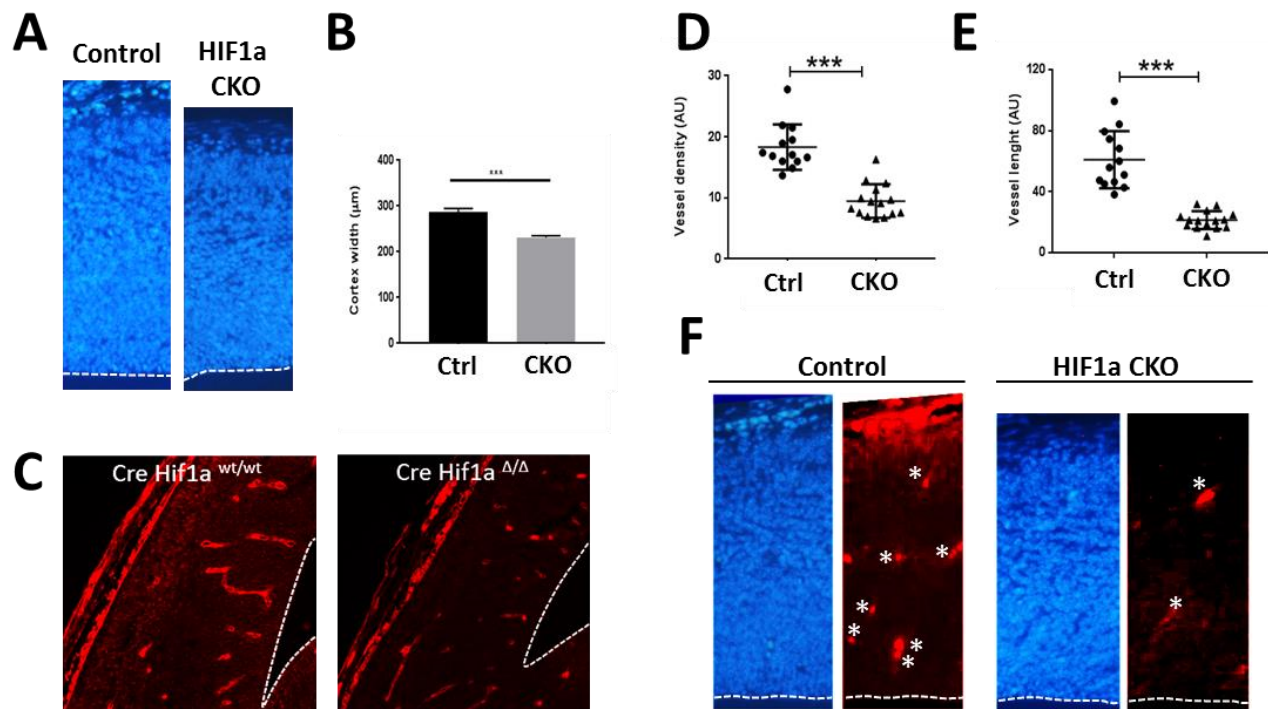


Figure 11: La perte de HIF-1 α au stade E14.5 provoque des altérations corticales et du réseau vasculaire comparables à celles observées au stade E16.5.

A, Coupe coronale de cortex embryonnaire au stade de développement E14.5 d'une souris témoin et d'une souris CKO contre coloré au DAPI.

B, Epaisseur moyenne (en μm) du cortex dans les embryons témoins et CKO.

C, Marquage immunofluorescent des vaisseaux à l'aide d'un anticorps dirigé contre la laminine sur un cerveau témoin et CKO. L'espace ventriculaire est délimité par une ligne pointillée blanche.

D et E, Quantification de la densité moyenne (D) et de la longueur moyenne (E) des vaisseaux détectés par un marquage laminine dans des cerveaux témoins et CKO.

F, Immunomarquage des cellules apoptotiques par la caspase-3 clivée dans les cerveaux témoins et CKO. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins auto-fluorescents.

En dépit d'une plus petite épaisseur corticale des cerveaux témoins à E14,5 en comparaison à celle des cerveaux E16.5 qui est liée au stade de développement, l'épaisseur corticale des cerveaux CKO à E14.5 présente une réduction significative par rapport à celle des cerveaux témoins E14.5 (Figure 11A et B, *** $p < 0.001$). Cet amincissement cortical est associé à une altération significative de la vascularisation embryonnaire estimée comme précédemment par la densité et la taille des vaisseaux immunomarqués avec un anticorps dirigé contre la laminine (Figure 11C à 11E, *** $p < 0.001$). Comme précédemment décrit à E16.5, aucun signe d'apoptose n'est observé dans les animaux CKO (Figure 11F).

Concernant les évènements mitotiques et la prolifération cellulaire, là encore à ce stade de développement, la perte de HIF-1 α dans les cellules GLAST provoque une diminution très forte du nombre de mitoses PH3⁺ positives aussi bien en localisation apicale (Figure 12 A et 12B, *** $p < 0.001$)

que basale (Figure 12D et 12E, *** $p < 0.001$) et sans différence significative du rapport divisions apicales symétriques/asymétriques estimé par la mesure de l'angle mitotique (Figure 12 C). Enfin nous retrouvons dans les CKO, une diminution significative de la prolifération cellulaire estimée par incorporation de BrdU des GR dans les zones ZV et ZSV (Figure 12 F et 12G).

L'analyse des différentes sous population Pax6, Tbr2 et Tbr1 réalisée dans les cerveaux témoins et CKO à E14.5 nous ont permis de montrer que les cerveaux CKO à E14,5 présentent comme ceux de E16.5, une perte significative du nombre de GR Pax6⁺ en comparaison avec les cerveaux témoins de E14.5 (Figure 13A et 13B, * $p < 0.01$) ainsi qu'une augmentation (ou accumulation) du nombre de PI Tbr2⁺ (Figure 13C et 13D, * $p < 0.05$) uniquement dans la ZV (Figure 13E, *** $p < 0.001$). Enfin, contrairement à ce que nous avons vu au stade de développement E16.5, la perte de HIF-1 α provoque une différenciation plus importante des PI Tbr2⁺ en neurones post-mitotiques Tbr1⁺ puisqu'ils sont retrouvés en plus grand nombre dans les cerveaux CKO E16.5 par rapport aux cerveaux témoins (Figure 13F et 13G, ** $p < 0.01$).

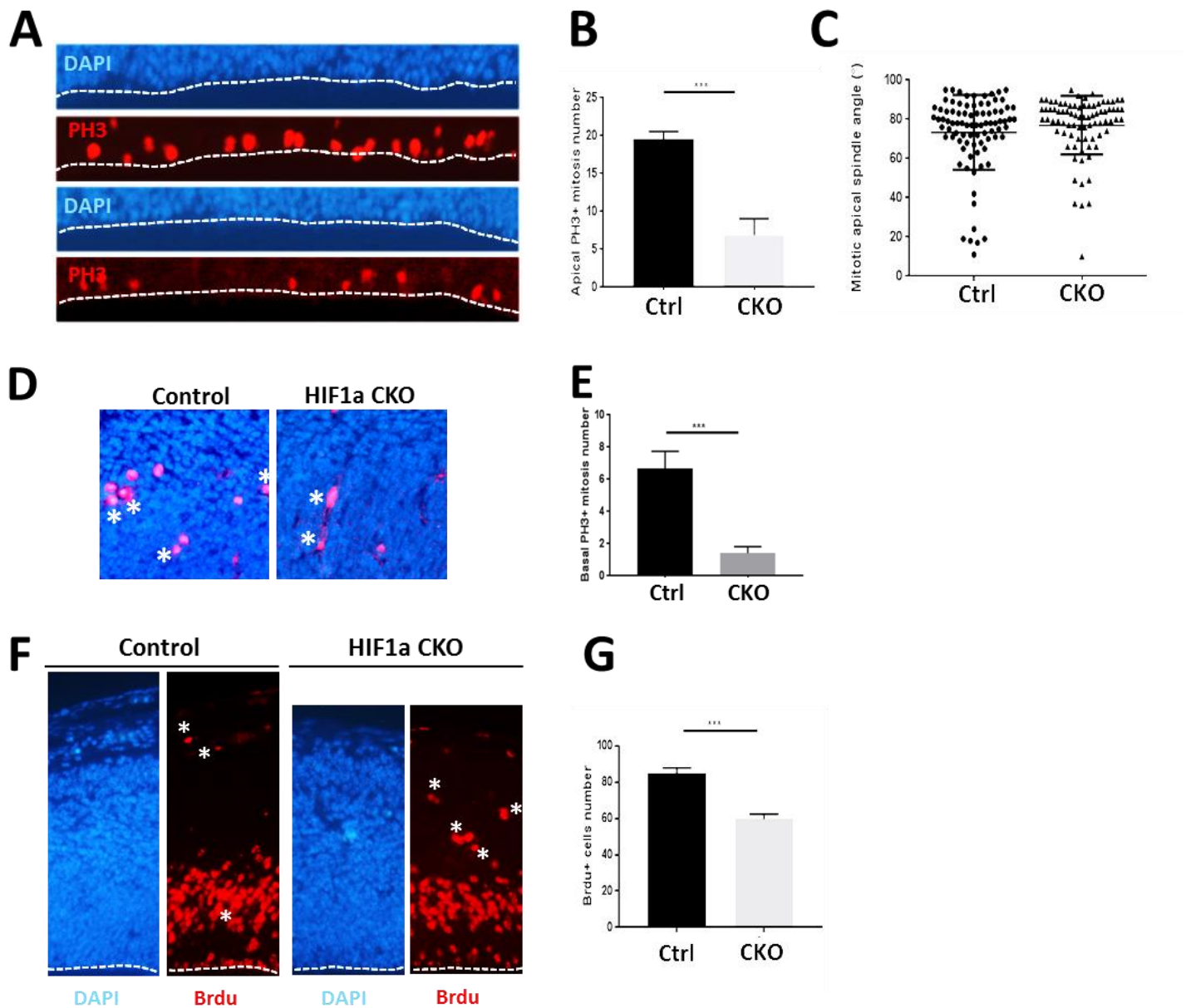


Figure 12: La perte de HIF-1 α au stade 14.5 provoque une diminution du nombre de mitoses et de la prolifération cellulaire.

A, Marquage immunofluorescent dirigé contre la phospho-histone H3 (rouge) de coupes coronales de cerveaux témoins et CKO au niveau de la bordure du ventricule délimitée par une ligne blanche pointillée.

B, Quantification du nombre de mitoses apicales PH3-positives.

C, Répartition de l'angle mitotique du plan de clivage des mitoses apicales dans des cerveaux témoins et CKO.

D, Marquage immunofluorescent dirigé contre la phospho-histone H3 (rouge) sur coupes coronales de cerveaux témoins et CKO au niveau de la zone basale du cortex. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins auto-fluorescents.

E, Quantification du nombre de mitoses basales PH3-positives.

F, Prolifération cellulaire estimée par un marquage immunofluorescent dirigé contre le BrdU deux heures après l'injection du BrdU chez la femelle gestante. Le bord du ventricule est délimité par une ligne blanche pointillée. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins auto-fluorescents.

G, Quantification du nombre de cellules en prolifération BrdU⁺ dans le cortex de cerveaux témoins et CKO.

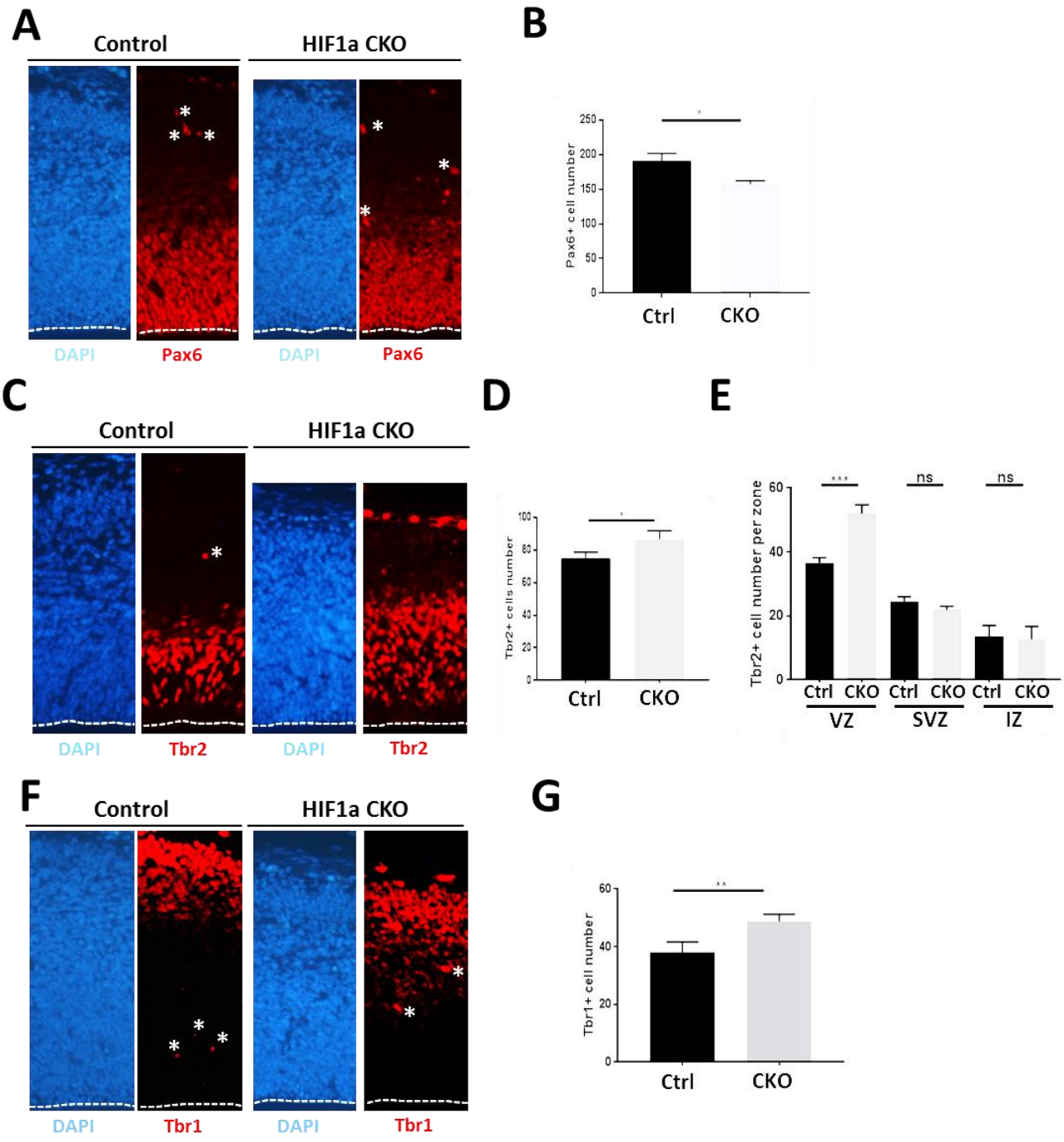


Figure 13: La perte de HIF-1 α au stade 14.5 induit une perte de GR Pax6⁺ et une augmentation du nombre de PI Tbr2⁺ et des neurones post-mitotique Tbr1⁺.

A, Immunomarquage des GR Pax6⁺ sur des coupes coronales de cerveaux témoins et CKO. Le bord du ventricule est délimité par une ligne blanche pointillée. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins auto-fluorescents.

B, Quantification du nombre total de GR Pax6⁺ dans des cerveaux témoins et CKO.

C, Immunomarquage des PI Tbr2⁺ sur des coupes coronales de cerveaux témoins et CKO. Le bord du ventricule est délimité par une ligne blanche pointillée. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins auto-fluorescents.

D et E, Quantification du nombre de PI Tbr2⁺ au niveau du cortex (**D**) et en fonction de leur localisation dans la ZV, ZSV et ZI (**E**).

F, Immunomarquage des neurones post-mitotique Tbr1⁺ sur des coupes coronales de cerveaux témoins et CKO. Le bord du ventricule est délimité par une ligne blanche pointillée. Les étoiles correspondent aux vaisseaux sanguins auto-fluorescents.

G, Quantification du nombre de neurones post-mitotiques Tbr1⁺ dans des cerveaux témoins et CKO.

IV. Discussion

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés à étudier le rôle de HIF-1 α dans le développement du cortex cérébral embryonnaire dans un modèle de souris knockout conditionnel inducible dans les cellules de la GR reposant sur le système Cre/LoxP (Glast-YFP-CreERT2 ; HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$). Deux jours après un gavage unique de la femelle gestante avec 3 mg de tamoxifène, les cellules YFP positives ayant recombinées sont retrouvées au bord des éminences ganglionnaires (EGL), à la frontière cortico-striatales et au niveau des zones ventriculaires et sous-ventriculaires du cortex embryonnaire dans les zones où les CSN sont normalement situées. Chez les souris HIF-1 α CKO, l'épaisseur totale du cortex est diminuée par rapport à celle des souris témoins. Cette réduction est observée dans chaque zone corticale (ZV, ZSV et ZI). La délétion de HIF-1 α deux jour après le traitement au tamoxifène n'altère pas la viabilité des cellules neurales aux stades de développement observés (E12,5→E14,5 ou E14,5→E16,5) ce qui suggère que la réduction de l'épaisseur du cortex n'est pas due à une augmentation des événements apoptotiques. En revanche, la densité et la longueur des vaisseaux sont significativement diminuées mettant en évidence que l'inactivation du gène HIF-1 α dans les CSN Glast⁺ affecte très rapidement et significativement la stabilité vasculaire de l'ensemble du cortex embryonnaire. Parallèlement, une perte significative du nombre des mitoses apicales et basales PH3-positives est observée chez les souris HIF-1 α CKO. Cette perte des mitoses apicales et basales est associée à une diminution significative de la prolifération cellulaire dans la zone ventriculaire. Enfin, le nombre de GR exprimant Pax6 et Sox2 est diminué au niveau de la ZV alors que le nombre des PI Tbr2⁺ est augmenté d'une manière significative dans la ZSV des cerveaux HIF-1 α CKO par rapport aux cerveaux témoins. Concernant la population des neurones post-mitotiques Tbr1⁺ localisés au niveau de la plaque corticale, la délétion de HIF-1 α provoque une diminution significative de leur nombre deux jours après un gavage au stade de développement E12, 5 (à E14, 5).

Le développement en 1998 d'une souris knock-out pour HIF-1 α (HIF-1 α KO) a démontré que HIF-1 α était essentiel pour le développement embryonnaire. En effet, ces animaux présentaient, entre autre, une altération importante de l'angiogenèse et un défaut de la fermeture du tube neural conduisant à une mort embryonnaire au stade E11 de gestation (Iyer et coll., 1998, Kotch et coll., 1999). Du fait de ces effets délétères précoces induits par l'inactivation totale de l'activité de HIF-1 α dans ce modèle, ce dernier ne pouvait pas permettre d'étudier la contribution de HIF-1 α dans la neurogenèse embryonnaire à des stades de développement plus tardifs. Ainsi, nous avons développé un modèle CKO conditionnel

inductible dans les cellules de la GR (exprimant GLAST) reposant sur le système Cre/Lox afin d'étudier plus précisément son rôle dans la neurogenèse corticale *in vivo* au stade de développement E14.5 et E16.5.

1. Les conséquences de la délétion de HIF-1 α dans les cellules GLAST⁺

1.1 Conséquences de la délétion de HIF-1 α sur la prolifération cellulaire

Nous avons observé que la délétion de HIF-1 α induit une diminution du nombre de cellules de la GR Pax6⁺ et Sox2⁺ au niveau de la zone ventriculaire. Cette diminution est associée à une altération de la prolifération cellulaire estimée par incorporation du BrdU. Ces premières données suggèrent que HIF-1 α est nécessaire au maintien de la prolifération des cellules GR, cellules faisant office de cellules souches au niveau de la zone ventriculaire. Nos résultats sont en accord avec des expériences de perte et de gain de fonction de HIF-1 α montrant que HIF-1 α maintient la GR dans un état de prolifération en empêchant leur engagement dans la différenciation (Lange et coll., 2016). Des résultats similaires ont été observés par Tomita et coll. dans un autre modèle HIF-1 α CKO (délétion de l'exon 13-15 dans les cellules exprimant la nestine ; Tomita et coll., 2003) mais à un stade plus tardif que dans notre modèle de souris. En effet, ces auteurs montrent que le télencéphale est visiblement plus fin à E19 en relation avec une diminution du nombre de cellules neurales sans toutefois avoir un impact sur l'apparence extérieure du cerveau (Tomita et coll., 2003).

Deux études de l'équipe menée par Storch publiées en 2015 et 2016 utilisant le modèle de Tomita, montrent qu'au stade E16 de développement, HIF-1 α est essentiel pour l'angiogenèse mais pas pour la prolifération des progéniteurs neuraux (Wagenführ et coll., 2015, 2016). Ces travaux de recherche portaient sur l'importance de HIF-1 α dans le développement du système dopaminergique central *in vivo* au niveau des progéniteurs du mésencéphale fœtal (Wagenführ et coll., 2016) et au niveau des progéniteurs apicaux de la ZV (Wagenführ et coll., 2015). Contrairement à nos résultats, ces études ne suggèrent pas d'implication directe de HIF-1 α dans le contrôle du développement cortical embryonnaire. La différence du ciblage cellulaire de la délétion de HIF-1 α (Nestine *versus* GLAST) ainsi que du domaine ciblé par la recombinaison (exon 13-15 *versus* exon 2) pourraient expliquer ces différences observées entre ces deux modèles de souris déficients pour HIF-1 α . En effet, les exons 13-15 floxés dans la souris de Tomita codent pour le domaine de transactivation COOH-terminal essentiel

pour la réponse à l'hypoxie, pour le recrutement optimal du coactivateur de protéine CREB-binding (CBP)/p300 et pour une localisation nucléaire efficace de HIF-1 α (dû à la présence d'une séquence NLS dans cette région ; Tomita et coll., 2003). Dans notre modèle, l'excision s'effectue au niveau de l'exon 2 qui code pour un domaine nécessaire à l'hétérodimérisation des sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β , indispensable pour que les liaisons avec les HRE des gènes cibles soient efficaces. Ainsi, la délétion de l'exon 2 empêche la formation du complexe HIF-1 α /HIF-1 β nécessaire à la fonction de facteur de transcription de HIF-1 α . Il serait intéressant d'étudier en parallèle ces deux modèles afin de déterminer pourquoi une telle différence existe. L'activation de la recombinaison sous un promoteur identique serait bien évidemment nécessaire pour définitivement conclure sur l'efficacité de l'une ou l'autre site de floxage.

Il serait également nécessaire de vérifier que les protéines HIF-1 α tronquées engendrées (dans ces deux modèles) qui n'ont plus la possibilité d'agir en tant que facteur de transcription *via* les HRE, n'aient pas pu acquérir de nouvelles propriétés pouvant interférer dans différents processus cellulaires.

Enfin si l'on considère que ces deux modèles produisent des protéines HIF-1 α tronquées sans activités résiduelles ou nouvelles, nous pouvons envisager que les conséquences de la déficience de HIF-1 α qui apparaissent de façon plus précoce et plus rapidement dans notre modèle pourraient s'expliquer par l'expression différentielle des promoteurs de la nestine et de GLAST. La nestine est exprimée à un stade précoce du développement, dans les cellules souches neuroépithéliales (Lendahl et coll., 1990) alors que GLAST apparaît plus tardivement au cours du développement, dans la GR (Shibata et coll., 1997). Alors que la nestine joue un rôle important dans le développement du système nerveux central notamment dans les mécanismes de repliement de la plaque neurale (Rakic et coll., 1972), GLAST intervient plus tardivement dans le développement notamment dans la différenciation gliale au niveau de la transition des cellules NE vers la GR, étape nécessaire pour débiter la neurogenèse embryonnaire (Shibata et coll., 1997 ; Hartfuss et coll., 2001 ; Barry et coll., 2008). La délétion de HIF-1 α étant sous la dépendance de GLAST (dans notre modèle) affecterait de manière plus importante la formation de la GR normalement retrouvée chez la souris au début de la neurogenèse aux stades E12-E13 de développement (Götz et Barde, 2005). Nos observations suggèrent également que c'est à ce moment précis du développement que HIF-1 α jouerait un rôle prépondérant dans la neurogenèse.

1.2. Conséquences de la délétion de HIF-1 α sur la division mitotique

L'équilibre précis des divisions de la GR et de la progéniture qui en résulte influence la taille et la fonction du néocortex mature. Ceci est illustré par des changements dans la taille du cerveau et est associé à une neurogenèse altérée. L'altération mitotique mise en évidence chez les animaux HIF-1 α CKO révélée par une diminution significative du nombre de mitoses apicales et basales pourrait en partie expliquer la diminution significative de l'épaisseur du cortex chez ces animaux. En effet, les cellules de la GR subissent des divisions prolifératives symétriques pour s'auto-renouveler et des divisions neurogéniques asymétriques pour produire une nouvelle GR et un neurone ou une nouvelle GR et un PI (Franco et Mueller, 2013). Les PI quant à eux, subissent deux divisions d'autorenouvellements avant de produire des neurones (Kowalczyk et coll., 2009). Les cellules en cours de divisions neurogéniques asymétriques (différenciation) présentent un angle mitotique théorique horizontal alors que les divisions prolifératives symétriques (expansion) qui permettent l'amplification des cellules progénitrices sont plutôt associées à des mitoses avec un angle vertical (Haydar et coll., 2003). Nos données montrent que l'angle moyen entre la plaque métaphasique et la surface ventriculaire, qui caractérise l'orientation moyenne du plan de clivage mitotique de la GR est comparable chez les souris HIF-1 α CKO et les souris témoins suggérant que la délétion de HIF-1 α ne semble pas influencer l'orientation du plan de clivage. La détermination du destin neurogénique ou prolifératif des divisions mitotiques n'était donc pas conclusive par ce type d'analyse. Sachant que la régulation du cycle cellulaire est liée à la régulation du cortex en développement, il serait intéressant de déterminer la durée des différentes phases du cycle cellulaire des CSN dans le cerveau des souris HIF-1 α CKO par rapport à des souris témoins (Arai et coll., 2011, Lange et coll., 2009, Pilaz et coll., 2009, Takahashi et coll., 1995). En effet, la durée du cycle cellulaire augmente progressivement tout en s'accompagnant d'une transition du mode prolifératif vers le mode de division neurogénique (Takahashi et coll. 1995). L'allongement du cycle cellulaire est principalement dû à l'augmentation de la durée de la phase G1 et conduit à une neurogenèse précoce (Calegari et Huttner 2003, Calegari et coll., 2005).

Comme précédemment évoqué, des analyses plus précises du processus mitotique pourraient nous fournir des informations afin de mieux comprendre le rôle de HIF-1 α sur le devenir des cellules de la GR. Outre l'analyse de l'orientation du fuseau mitotique qui permet dans certain cas d'estimer la proportion de divisions symétriques et asymétriques (Asami et coll., 2011 ; Konno et coll., 2008 ;

LaMonica et coll., 2013 ; Lizarraga et coll., 2010 ; Mora-Bermúdez et al., 2014 ; Xie et al., 2013 ; Yingling et al., 2008 ; Delaunay et al., 2014), l'analyse de la durée des différentes phases mitotiques, même si encore peu utilisée, pourrait nous apporter des informations complémentaires. Dans une étude effectuée en 2016 par Louis-Jan Pilaz et coll., la délétion du gène Magoh, connu par produire des défauts de microcéphalie et de neurogenèse sévère et qui est hautement exprimé dans les tissus prolifératifs au cours du développement (McMahon et coll., 2014, Silver et coll., 2010), a été démontré comme induisant une augmentation des fractions de cellules en pro-métaphase et celles des cellules en métaphases à E14.5. Cette augmentation de cellules prométaphasiques et métaphasiques était responsable de l'augmentation du nombre de divisions neurogéniques. Cette relation entre la durée mitotique et le destin cellulaire est plus prononcée à des stades embryonnaires avancés (pas à E12.5) (Louis-Jan Pilaz et coll., 2016). Ainsi, il serait intéressant de déterminer l'impact de la délétion de HIF-1 α sur la durée mitotique et plus spécialement sur la durée de la prométaphase/métaphase. Cela pourrait nous permettre d'établir un lien entre la durée de la prométaphase/métaphase et l'augmentation des neurones post-mitotiques à E14.5 observées dans notre modèle. Par conséquent, la délétion de HIF-1 α pourrait augmenter la fraction des cellules retardées en prométaphase/métaphase au niveau apical augmentant ainsi les neurones post-mitotiques Tbr1. Cette augmentation du nombre de mitoses à tendance neurogénique se produirait au détriment des mitoses au pouvoir prolifératifs au niveau apical. Inversement, la délétion de HIF-1 α pourrait induire une diminution de la durée prométaphasique/métaphasique des mitoses basales conduisant une augmentation des PI Tbr2 $^{+}$ au niveau de la ZSV.

Parmi les acteurs moléculaires démontrés comme étant régulateurs de la phase mitotique, SAS-4 code pour une protéine nécessaire à la biogenèse du centriole dans le cerveau de souris en développement (Insolera et coll., 2014, Schmidt et coll., 2009, Tang et coll., 2009, Basto et coll., 2006). La délétion homozygote de SAS-4 entraîne une perte progressive des centrioles et des centrosomes qui par conséquent augmente le nombre de mitoses et prolonge la durée de la prophase et de la prométaphase entraînant ainsi un retard dans la progression mitotique. Les progéniteurs mitotiques des souris déficientes pour SAS-4 présentent des défauts dans l'assemblage du pôle du fuseau mitotique, ce qui déclenche un retard mitotique avec une diminution de 40% du nombre des neurones des couches superficielles Cux1 $^{+}$ (Insolera et coll., 2014). Ces données mises en relation avec nos observations montrant que la délétion de HIF-1 α entraîne une diminution du nombre des mitoses et une augmentation du nombre des neurones post-mitotiques suggèrent qu'il pourrait être intéressant de rechercher une possible implication de SAS-4 dans l'induction de ces effets faisant suite à la délétion

de HIF-1 α . La délétion de HIF-1 α ne pourrait-elle pas augmenter le niveau de SAS-4, diminuant ainsi le nombre des mitoses dans le cerveau embryonnaire à E14.5 et à E16.5 et augmentant le nombre des neurones post- mitotiques ? Cela pourra être une piste à explorer surtout qu'aucun lien n'a encore été établi entre HIF-1 α et SAS-4 et qu'aucune étude n'a à ce jour été publiée. L'étude de cette cascade moléculaire serait aussi intéressante afin d'expliquer d'autres effets observés dans notre étude. Ainsi, l'absence d'apoptose suite à la délétion de HIF-1 α dans notre modèle d'étude pourrait être due à une augmentation de SAS-4 puisqu'il a déjà été rapporté que la délétion de SAS-4 provoque une augmentation de l'apoptose d'une manière p53 dépendante. L'augmentation des PI Tbr2⁺ observée chez les souris HIF-1 α CKO pourrait également s'expliquer par une augmentation de SAS-4 induit par la délétion de HIF-1 α puisqu'en absence de SAS-4, les PI Tbr2⁺ sont diminués dans le modèle d'Insolera et coll.

1.3. Conséquences de la délétion de HIF-1 α sur la différenciation neuronale

Le rôle de HIF-1 α dans le maintien du caractère souche indifférencié (Mohyeldin et coll., 2010) et de l'état prolifératif des CSN (Zhao et coll., 2008) a déjà été relativement bien démontré. En revanche, son rôle spécifique dans la différenciation neuronale des CSN corticales au cours du développement embryonnaire n'a pas été encore bien étudié. Dans notre modèle de souris HIF-1 α CKO, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet de la délétion de HIF-1 α sur la différenciation des CSN embryonnaires des souris à E14.5 et E16.5. Nos résultats montrent que la délétion de HIF-1 α induit une augmentation du nombre des neurones post-mitotiques Tbr1⁺ à E14.5 et des PI Tbr2⁺ à E14.5 et à E16.5. De manière similaire, Lange et coll montrent que la délétion hétérozygote de HIF-1 α à E13.5, effectuée strictement dans la GR dorsale (promoteur Emx1-Cre), stimule la différenciation neurogénique sans induire une apoptose. Ceci se traduisant par une augmentation de 40 % du nombre de la GR Ngn1⁺, de 20 % du nombre des PB neurogéniques, et de 18 % du nombre des PB néoformés. Cette différenciation observée suite à la délétion de HIF-1 α est induite au détriment de la GR en expansion EdU⁺/Ki67⁺ et des PI Tbr2⁻/Ngn1⁻ (Lange et coll., 2016). Inversement, ces mêmes auteurs ont également démontré que la transfection de HIF-1 α à E13.5 maintient la GR dans la ZV/ZSV à E16.5, diminue le nombre des neurones qui ont déjà atteint la plaque corticale et retarde la migration des neurones néoformés. Ainsi, ils suggèrent que la surexpression transitoire de HIF-1 α retarde le passage vers la différenciation et maintient les cellules dans un état indifférencié (Lange et coll., 2016).

Ces observations sont en accord avec les effets observés dans notre étude quant à la diminution des CSN indifférenciées Sox2⁺/Pax6⁺ et le passage vers la différenciation.

Conformément à la littérature nous avons trouvé que les cellules Tbr1⁺ localisées dans la ZI du cortex présentent une faible expression de Tbr1 alors que les cellules situées au niveau de la plaque corticale expriment fortement Tbr1 (Englund et coll., 2005). Dans notre modèle la délétion de HIF-1 α induit une augmentation significative des neurones post-mitotiques Tbr1⁺ dans la plaque corticale à E14.5 des souris HIF-1 α CKO. Alors qu'à E16.5, la délétion de HIF-1 α augmente la différenciation des progéniteurs intermédiaires Tbr2⁺ sans augmenter significativement le nombre des neurones post-mitotiques Tbr1⁺ localisés au niveau de la plaque corticale. L'absence d'augmentation significative des neurones post-mitotiques Tbr1⁺ à E16.5 pourrait être expliquée par une expression de HIF-1 α moins importante à E16.5 qu'à E14.5. Ainsi, le délai de traitement ne serait pas assez long pour pouvoir induire une augmentation significative des neurones post-mitotiques Tbr1⁺.

Autre hypothèse, l'absence d'augmentation significative des neurones post-mitotiques Tbr1⁺ suite à la délétion de HIF-1 α à E16.5 pourrait être due à une migration neuronale moins importante à E16.5 qu'à E14.5 accumulant probablement les PI Tbr2⁺ d'une manière plus importante à E16.5 qu'à E14.5. Dans le but d'analyser le pouvoir neurogénique induit par la perte de HIF-1 α à E14.5 et à E16.5, il serait intéressant d'analyser la formation des PB à partir de la GR en analysant la fraction de la GR en expansion Pax6⁺ ou Sox2⁺/Tbr2⁻/Ngn1⁻, la population de la GR neurogénique Pax6⁺ ou Sox2⁺/Tbr2⁻/Ngn1⁺, ainsi que la population des PB Tbr2⁺/Ngn1⁺. L'analyse de ces différentes populations cellulaires nous permettrait de comprendre plus précisément comment se fait le passage de l'expansion vers la différenciation suite à la délétion de HIF-1 α . Nous observerons probablement une augmentation du nombre de la GR neurogénique et/ou une augmentation des PB neurogéniques, et/ou une diminution de la GR proliférative.

La différenciation neuronale induite par la délétion de HIF-1 α n'est pas observée dans l'étude de Milosevic et coll. (2007). Ainsi, ils n'ont rapporté aucun impact sur la différenciation des précurseurs corticaux frontaux. Par contre, l'effet était principalement observé dans les précurseurs du mésencéphale (Milosevic et coll., 2007). Ces auteurs ont observé que la délétion de HIF-1 α dans les précurseurs du mésencéphale induit des altérations de la morphologie neuronale ainsi qu'une réduction significative des courants de sodium, suggérant une différenciation morphologique et fonctionnelle altérée (Milosevic et coll., 2007). Les différences observées dans leur étude par rapport à nos résultats

pourraient s'expliquer par le fait que l'effet de la délétion de HIF-1 α a été étudié *in vitro* dans des conditions hypoxiques (3%) qui ne prend donc pas en compte l'ensemble des interactions cellulaires pouvant avoir lieu *in vivo*. D'autre part, dans leur étude la délétion de HIF-1 α se fait *via* le promoteur de la Nestine alors que le floxage de HIF-1 α dans notre étude est sous la dépendance de promoteur GLAST.

1.4. Conséquences de la délétion de HIF-1 α sur l'épaisseur corticale, l'apoptose et l'angiogenèse

La diminution de l'épaisseur corticale pourrait s'expliquer par une diminution de l'abondance des progéniteurs provoquée par une mort cellulaire induite. Par exemple, il a été montré qu'une hypoxie à 10% induite dans le cerveau embryonnaire provoque une apoptose cellulaire conduisant à une diminution du volume et l'épaisseur corticale (Wagenführ et coll., 2015). Dans notre modèle, malgré la mise en évidence d'une diminution de l'épaisseur corticale et de l'angiogenèse faisant suite à la délétion de HIF-1 α , aucune mort apoptotique estimée par un marquage caspase 3 (CC3) clivée n'a été détectée. La diminution de la taille corticale et de la prolifération de la GR au niveau ventriculaire ne s'explique donc pas par une augmentation de la mort cellulaire apoptotique. Même si peu probable, cette absence de mort cellulaire pourrait s'expliquer par le temps court de recombinaison (48 heures) qui pourrait ne pas être assez long pour induire une apoptose suite à la perte de HIF-1 α , mais qui, par contre, est suffisant pour avoir un effet drastique sur l'angiogenèse et la prolifération des progéniteurs neuraux. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'envisager des expériences avec un délai post traitement plus important. Par exemple, un traitement à E12,5 pour une analyse des cerveaux à E16,5. Cette proposition s'appuie sur le fait que Tomita et coll ont pu mettre en évidence une apoptose dans le télencéphale cortical des souris à E19 alors qu'aucune cellule apoptotique n'était visible à E15,5 dans leur modèle de souris HIF-1 α déficiente. Il est à noter que dans cette étude, les cellules apoptotiques sont associées avec une angiogenèse déficiente, suggérant aussi que l'apoptose neurale dans le cerveau embryonnaire déficient en HIF-1 α est au moins en partie due à un manque d'apport sanguin (Tomita et coll, 2003).

Une autre alternative serait que l'absence de HIF-1 α empêche la mise en place rapide de la machinerie apoptotique. HIF-1 α régule positivement les événements apoptotiques *via* la régulation de différents gènes comme les gènes NDRG, NOXA, NIP3, p53 et p21 (Dengler et coll, 2014 ; Piret et

coll., 2002). L'apoptose est augmentée dans les cellules souches embryonnaires (HIF-1 $\alpha^{+/+}$), mais pas dans les cellules souches embryonnaires ayant des gènes HIF-1 α inactivés (HIF-1 $\alpha^{-/-}$) (Carmeliet et coll., 1998). De plus, l'interaction entre p53 et HIF-1 α est responsable de la promotion de la mort neuronale dans des modèles d'ischémie du SNC, grâce à l'expression accrue p53 dépendante des gènes pro-apoptotiques (Haltermann et coll., 1999a, 1999b). Inversement, la délétion de HIF-1 α dans les neurones corticaux hypoxiques *in vitro* les a protégés de la mort neuronale (Haltermann et coll., 1999a). Ces études mettent en évidence donc que l'absence de HIF-1 α pourrait réduire les événements apoptotiques ce qui pourrait expliquer l'absence de l'apoptose observée dans notre étude suite à la délétion de HIF-1 α dans les CSN.

2. La réduction de l'angiogenèse induite par la délétion de HIF-1 α pourrait-elle avoir un impact sur la diminution du nombre de GR et de la taille du cortex ?

Pendant la neurogenèse, les cellules de la glie radiaire passent de l'expansion à la génération des neurones directement ou indirectement *via* la production des progéniteurs intermédiaires (progéniteurs basaux PB) (Gotz et Huttner, 2005, Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009). Le moment du passage de l'expansion GR à la génération des PB détermine le nombre de neurones dans le cortex et leur identité cellulaire dans les couches corticales (Franco et Muller, 2013). Ainsi, la régulation appropriée de l'expansion de la GR est une étape importante dans la neurogenèse, mais les signaux et les mécanismes sous-jacents ne sont pas complètement compris.

2.1. Relation entre l'angiogenèse et la régulation des CSN embryonnaires

Des signaux différents issus de la niche des cellules souches corticales régulent la différenciation de la GR (Johansson et coll, 2010, Bjornsson et coll, 2015). Dans divers organes en développement, les vaisseaux sanguins sont des composants essentiels des niches des cellules souches qui régulent l'équilibre entre l'expansion et la différenciation des précurseurs (Cleaver et Dor, 2012, Ramasamy et coll, 2015). HIF-1 α régule l'angiogenèse durant le développement embryonnaire cortical (Hashimoto et Shibasaki, 2015) qui est elle-même corrélée avec l'initiation de la neurogenèse *in vivo* (Miyama et coll, 1997, Shen et coll, 2004). Nous avons démontré que la délétion de HIF-1 α à E14.5 et à E16.5 diminue très significativement le nombre et la taille des vaisseaux en relation avec le niveau du

VEGF suggérant que la présence de HIF-1 α au niveau des cellules souches neurales GLAST⁺ est nécessaire pour la formation de vaisseaux sanguins *in vivo*. Ces données sont en accord avec différentes données de la littérature qui ont montré que la délétion de HIF-1 α induisait un déficit vasculaire à E10.5 (Iyer et coll., 1998). Plus spécifiquement, Tomita et coll. ont montré à l'aide de leur modèle de souris CKO conditionnelle inductible pour HIF-1 α (exon 13-15) dans les CSN exprimant la nestine, que l'absence de HIF-1 α dans ces CSN provoquait une diminution de la densité des vaisseaux endothéliaux CD31⁺ au niveau du cortex en développement à partir du stade de développement E19. Cette altération de l'angiogenèse est, par ailleurs associée avec l'apparition de cellules neurales apoptotiques (Tomita et coll., 1998). Ces données nous amènent à nous demander si la diminution de l'angiogenèse induite par un HIF-1 α dysfonctionnel pourrait contribuer à la diminution de la prolifération de la GR observée au niveau de la zone ventriculaire. Une étude de 2016 a mis en évidence que la perturbation de la formation de la niche vasculaire dans le cerveau en développement par la délétion des vaisseaux péri-ventriculaires *in vivo* (souris Gpr124 KO, expression restreinte aux cellules endothéliales et aux péricytes) augmente l'extension latérale du cortex induite par l'expansion des cellules de la GR Pax6⁺. Elle augmente la prolifération des progéniteurs corticaux EdU⁺/Ki67⁺ et diminue les neurones néoformés EdU⁺/Ki67⁻ induisant une inhibition de la neurogenèse et une augmentation des CSN. La perturbation de l'angiogenèse diminue aussi la formation des PB dérivés de la GR démontré par une diminution spécifique des progéniteurs Tbr2⁺/EdU⁺ localisées dans la ZV. Ce passage de l'expansion vers la neurogenèse est aussi confirmé par une induction de l'expansion de la GR Ngn1⁻/Tbr2⁻, une diminution significative de la GR neurogénique Ngn1⁺/Tbr2⁻ à E13.5 sans induire d'apoptose. Au total, ces données montrent que la délétion sélective des vaisseaux *in vivo* induit l'expansion de la GR et diminue la différenciation (Lange et coll., 2016). Ces auteurs ont également montré que cette expansion de la GR au détriment de la différenciation est associée avec une augmentation de HIF-1 α (le niveau de HIF-2 α restant indétectable). Ceci suggère que les vaisseaux sanguins dans le cortex cérébral en développement régulent le passage de l'expansion à la différenciation de la GR et à la neurogenèse (Lange et coll., 2016). Nos résultats montrent que la diminution de l'angiogenèse induite par la délétion de HIF-1 α est associée à une diminution du nombre de cellules GR Pax6⁺ et Sox2⁺ prolifératives et augmente leur différenciation en progéniteurs intermédiaires Tbr2⁺ (à E14,5 et E16,5) et en neurones post-mitotiques Tbr1⁺ (à E14.5). Cela pourrait être attribué au fait que l'inhibition directe des vaisseaux sanguins *in vivo* pourrait inhiber directement la neurogenèse en augmentant l'expansion de la GR apicale au détriment de la différenciation (Lange et coll., 2016), alors que l'inhibition indirecte de l'angiogenèse *via* la délétion de HIF-1 α pourrait induire

une diminution de l'expansion de la GR et/ou stimuler la différenciation neurogéniques du fait d'une diminution de la sécrétion des facteurs angiogéniques.

D'autres études ont montré que la délétion du VEGF dans le cerveau en développement induisait un défaut vasculaire et inhibait la prolifération des progéniteurs neuraux (Haigh et coll., 2003, Raab et coll., 2004). Cette diminution de la prolifération de la GR pourrait être attribuée à l'absence de la stimulation directe de la GR par le VEGF (Jin et coll., 2002, Kirby et coll., 2015, Lange et coll., 2016). En accord avec ces données, la diminution de l'angiogenèse et du VEGF induite *via* la délétion de HIF-1 α dans notre modèle de souris pourrait être responsable de la diminution du nombre de cellules de la GR Pax6⁺ et Sox2⁺ au niveau ventriculaire.

2.2. Relation entre l'angiogenèse et la taille corticale

La régulation de l'équilibre entre l'expansion et la différenciation des CSN influence la taille corticale. Les différences dans l'abondance des progéniteurs, les capacités de prolifération et la neurogenèse chez les espèces de mammifères sont probablement la raison des variations de la taille du cerveau et de la surface corticale (Borrell et Reillo, 2012; Chenn et Walsh, 2002; Fish et coll., 2008). Puisque cette régulation s'est révélée altérée suite à la délétion de HIF-1 α , la diminution de la taille corticale au niveau des zones ventriculaire, sous-ventriculaire et intermédiaire à E14.5 et à E16.5 observée dans notre étude pourrait s'expliquer par la réduction de l'angiogenèse qui réduit l'expansion de la GR. Tomita et coll. montrent ainsi dans leur modèle que HIF-1 α maintient l'épaisseur corticale *via* le maintien de l'intégrité vasculaire (Tomita et coll., 2003). La restauration de l'épaisseur corticale dans des cerveaux HIF-1 α CKO faisant suite à l'expression ectopique d'un plasmide codant pour HIF-1 α après électroporation au niveau du télencéphale embryonnaire confirme cette hypothèse (Tomita et al., 2003). Inversement, quand la délétion de HIF-1 α (exon 13-15 sous le promoteur de la nestine) n'affecte pas le nombre des progéniteurs apicaux de la ZV, cela empêche l'induction des changements dans l'épaisseur et dans la cytoarchitecture corticale confirmant une autre fois encore l'influence des cellules de la GR sur l'épaisseur et la taille du cortex (Wagenführ et coll., 2015).

3. La diminution de la taille du cortex observée au niveau du télencéphale dorsal embryonnaire pourrait-elle être due à la diminution des interneurons GABAergiques provenant des éminences ganglionnaires ?

Le cortex des rongeurs contient environ 36% de glie et environ 64% de neurones (Ren et coll., 1992, Vasistha et coll, 2015). Parmi les neurones, ~ 25% sont constitués d'interneurones de type GABAergiques alors que le reste sont principalement des neurones excitateurs glutaminergiques (Ren et coll., 1992, Vasistha et coll, 2015). En d'autres termes, pour 100 cellules corticales, 64 cellules sont des neurones dont 16 seraient des interneurons. Alors que les neurones glutamatergiques du néocortex sont générés localement dans le prosencéphale dorsal (ou pallium), les interneurons GABAergiques sont générés dans les éminences ganglionnaires (EG) du cerveau antérieur ventral (ou sous-pallium). Le sous-pallium comprend les éminences ganglionnaires médiales, latérales, et caudales (EGM, EGL et EGC, respectivement) et la zone pré-optique (POA). Le EGM et le EGC génèrent la grande majorité des interneurons corticaux mammifères (Liu et coll., 2018, Tamamaki et coll., 1997, Lavdas et coll., 1999, Wichterle et coll., 1999, Nery et coll., 2002, Xu et coll., 2004) aux stades de développement situés entre E11.5 et E14.5. Après E15.5 les interneurons sont produits à partir de l'EGM et de l'EGL (Tanaka et coll., 2003). Entre E12.5-E14.5, les interneurons migrent majoritairement dans la zone marginale (ZM) et dans la zone intermédiaire. Après E15.5, ils migrent également au niveau de la ZSV/ZI (Tanaka et coll., 2003).

Puisque l'expression de GLAST dont dépend la délétion de HIF-1 α dans notre modèle (Figure 1) est fortement retrouvée au niveau des éminences ganglionnaires latérales et médianes (EGL et EGM), il est intéressant de se demander si l'absence de HIF-1 α ne pourrait pas altérer la migration des interneurons provenant du sous-pallium, et plus spécialement ceux provenant de l'EGL et l'EGM en direction du cortex. Cette hypothèse serait en accord avec le fait que la génération des interneurons est liée à l'expression de combinaisons particulières de facteurs de transcription au niveau des cellules progénitrices du sous-pallium (Wonders et Anderson, 2006, Flames et coll., 2007, Wonders et coll., 2008). Il serait ainsi intéressant d'investiguer plus précisément le rôle de HIF-1 α dans la migration des interneurons vers le cortex dans le contexte d'une déficience de HIF-1 α au niveau des cellules exprimant GLAST au niveau des éminences ganglionnaires.

Autre point, les cellules de la GR fournissent une matrice structurelle pour l'emplacement des interneurons dans le cortex en développement. Une fois que les interneurons ont atteint le cortex par une migration de type tangentielle, ils ont la possibilité d'adopter une trajectoire radiale jusqu'à l'étape finale de leur parcours dans la plaque corticale (Yokota et coll., 2007). Après la délétion de HIF-1 α dans les CSN embryonnaires exprimant le GLAST, nous avons observé une réduction significative de la GR apicale dans la zone ventriculaire. Ainsi la perte de cette GR, décrite comme étant régulatrice de la migration des interneurons, pourrait, par sa diminution, altérer la migration et donc le nombre des interneurons arrivant jusqu'à la plaque corticale par migration tangentielle, provoquant ainsi une réduction de l'épaisseur corticale.

Ces altérations pourraient également impliquer des facteurs ou voies moléculaires qui pourraient avoir un rôle dans la régulation de la migration des interneurons et dont leurs expressions seraient dépendantes de HIF-1 α . Parmi les facteurs connus comme jouant un rôle de régulateurs dans la migration des interneurons, il existe la voie SDF-1/CXCR4 (Tiveron et coll., 2006). SDF-1 qui est une protéine chimiokine (encore appelée CXCL12) est exprimée dans la ZSV/ZI, de manière importante à E12.5 pour diminuer progressivement avec le stade de développement pour devenir indétectable à E18.5 (Daniel et coll., 2005). Son récepteur CXCR4, quant à lui, est exprimé dans le télencéphale au niveau des populations neuronales différenciées à E12.5, E14.5 et E17.5 pour diminuer à l'âge postnatal (Tissir et coll., 2004). Cette voie pourrait jouer un rôle dans les altérations observées dans notre modèle de souris déficientes pour HIF-1 α pour plusieurs raisons :

1- HIF-1 α régule SDF-1 qui permet de réguler la migration des progéniteurs neuraux en conditions hypoxiques (3%) (Yin et coll., 2013) et les processus développementaux dans le cerveau embryonnaire (Schneider et coll., 2012). L'expression de SDF-1 est par ailleurs associée au potentiel d'invasion du cortex par les interneurons (Daniel et coll., 2005).

2 - SDF-1 est nécessaire pour la migration radiale (neurones de projections) et tangentielle (interneurons) dans le cortex embryonnaire (Liapi et coll., 2008).

3 - Le niveau des transcrits de SDF-1 dans le cortex embryonnaire (E13.5) mutant pour Pax6^{-/-}, ayant des défauts de migration et de différenciation (Manuel et Price, 2005) est totalement absent et la migration des interneurons provenant des éminences ganglionnaires est altérée, suggérant que Pax6 régule le facteur SDF-1 dans le cortex embryonnaire qui est nécessaire à la migration des interneurons dans la voie ZV/ZSV (Tiveron et coll., 2006). Or il a été récemment montré que l'augmentation *in vivo* de HIF-1 α provoquée par une hypoxie chronique prénatale induit une augmentation de cellules exprimant Pax6 suggérant que HIF-1 α est capable de réguler positivement Pax6 (So et coll., 2017),

nous pouvons émettre l'hypothèse que HIF-1 α serait capable de réguler SDF1 par l'intermédiaire de Pax6.

4 - Les souris CXCR4 mutants ont une taille de cortex réduite mais avec une organisation corticale intacte (Tiveron et coll., 2006).

Au total, ces données nous incitent à proposer l'hypothèse suivante qui devra être bien évidemment évaluée : la délétion de HIF-1 α pourrait provoquer une altération de la migration des interneurons provenant des éminences ganglionnaires *via* la voie HIF-1 α /Pax6/SDF1-1/CXCR4.

4. La voie Wnt/ β -caténine pourrait-elle réguler les progéniteurs ventriculaires Pax6⁺ et les progéniteurs intermédiaires Tbr2⁺ d'une manière HIF-1 α dépendante ?

Nous avons observé que la délétion de HIF-1 α dans le cerveau embryonnaire à E16.5 induit une réduction de la population proliférative de la glie radiaire Pax6⁺ dans la zone ventriculaire et une augmentation significative des progéniteurs intermédiaires Tbr2⁺ dans la zone sous ventriculaire. Quels peuvent être les acteurs moléculaires régulés par HIF-1 α qui pourraient être impliqués dans les effets observés ?

La voie Wntless (Wnt)/ β -caténine est une voie de prolifération particulière décrite comme nécessaire à la régulation des CSN embryonnaires, à la détermination du devenir cellulaire et à la prolifération cellulaire (Ciani et Salinas., 2005). L'activation de la voie Wnt/ β -caténine est caractérisée 1) par la stabilisation de la β -caténine cytoplasmique après engagement du récepteur par les ligands Wnt, 2) par la translocation nucléaire de la β -caténine, 3) par l'interaction de la β -caténine avec les facteurs de transcription du facteur de liaison lymphoïde amplificateur-1/T-cellule-1 (LEF-1/TCF); 4) et par la stimulation des gènes cibles. Des études ont rapporté que dans les cellules souches embryonnaires, les signaux Wnt favorisaient l'autorenouvellement des CSN *via* l'accumulation de β -caténine et *via* son interaction avec d'autres facteurs de transcription comme TCF-1 ce qui favorise la prolifération par les facteurs de transcription LEF/TCF induits par l'expression de la cycline D1 (stimulé par wnt/ β -caténine) (Mazumdar et coll., 2010, Bizen et coll., 2014). D'autre part la β -caténine est fortement exprimée dans le cerveau embryonnaire en développement (Chenn et Walsh., 2002). Il est également intéressant de noter que :

- HIF-1 α est décrit comme capable de moduler la signalisation Wnt/ β -caténine dans les cellules souches neurales embryonnaires (Lee et coll., 2009) en améliorant l'activation de la β -caténine et l'expression des effecteurs en aval LEF-1 et TCF-1 (Mazumdar et coll., 2010).

- La signalisation Wnt / β -caténine active Pax6 au niveau transcriptionnel et contrôle la prolifération et la neurogenèse des CSN *via* un site de liaison de TCF/LEF-1 présent dans la région promotrice de Pax6 (Gan et coll., 2014). *In vivo*, la délétion de β -caténine diminue le nombre des cellules de la GR Pax6⁺ à E15.5 et E16.5 (Gan et coll., 2014).

- Enfin, l'activation de la β -caténine favorise la prolifération des progéniteurs neuraux dans le cortex en développement en induisant leur ré-entrée dans le cycle cellulaire (Chenn et Walsh., 2002, Wrobel et coll., 2007). Au contraire, la perte de fonction de la β -caténine provoque une sortie précoce du cycle cellulaire associée à une neurogenèse prématurée (Woodhead et coll., 2006, Machon et coll., 2007). Par ailleurs, la surexpression d'une β -caténine stabilisée semble retarder la maturation de la glie radiale en progéniteurs intermédiaires Tbr2⁺, ce qui suggère que la régulation négative de la signalisation de la β -caténine à E14.5 peut être importante dans le développement des progéniteurs intermédiaires (Wrobel et coll., 2007, Mutch et coll., 2010).

Ainsi l'ensemble de ces données suggèrent que la diminution des progéniteurs ventriculaires Pax6⁺ et que l'augmentation des progéniteurs intermédiaires Tbr2⁺, induites par la délétion de HIF-1 α dans notre modèle de souris, pourraient impliquer la voie HIF-1 α /Wnt/ β -caténine/LEF-1/TCF. Il sera donc intéressant d'essayer de mieux comprendre quelles sont les conséquences *in vivo* de l'absence de HIF-1 α sur la voie Wnt/ β -caténine et sur la régulation des cellules de la GR Pax6⁺ et des progéniteurs intermédiaires Tbr2⁺.

RESULTATS ET DISCUSSION

HIF-1 α DANS LA MIGRATION RADIO-INDUITE

I. Introduction

L'objectif des traitements mis en place contre le cancer est d'éradiquer la totalité des cellules tumorales du patient retrouvées à la fois au niveau de la tumeur primitive mais également sous forme de cellules métastatiques issues de la tumeur primitive. Actuellement, les principaux protocoles mis en place en oncologie clinique reposent sur la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie (Baskar et coll., 2014). De manière générale, plus de la moitié des patients atteints d'un cancer sont susceptibles de recevoir un traitement incluant une radiothérapie (RT) (Baskar et coll., 2014; Begg et coll., 2011; Delaney et coll., 2005; Park et coll., 2012). L'approche thérapeutique par radiothérapie est privilégiée chez les patients présentant des tumeurs inopérables ou incomplètement réséquées et chez les patients en récurrence d'un premier traitement (Baskar et coll., 2014; Durante et Loeffler, 2010). Actuellement, la radiothérapie ainsi que la chirurgie et la chimiothérapie sont considérées comme l'une des principales modalités de traitement en oncologie clinique.

Outre l'aspect bénéfique que peut apporter la mise en place d'un protocole de radiothérapie afin d'éradiquer la tumeur, il est décrit depuis plusieurs décennies que les rayonnements ionisants peuvent exercer des effets « contre productifs » sur les cellules cancéreuses retrouvées au niveau de la tumeur. De nombreux travaux descriptifs (F von Essen, 1991) ou plus fondamentaux (Moncharmont et coll., 2014) suggèrent notamment qu'une irradiation dans différents types de cancers pourrait favoriser la migration cellulaire des cellules cancéreuses pouvant à terme favoriser la formation de métastases aboutissant à des récurrences (Rofstad et coll., 2004; Vilalta et coll., 2014).

Ces données sont d'autant plus intéressantes qu'elles pourraient expliquer, au moins en partie, pourquoi malgré l'amélioration des traitements combinant la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, le Glioblastome Multiforme conserve un très mauvais pronostic (Stupp et coll., 2009). Les récurrences s'expliqueraient, en partie, par l'existence au sein des tumeurs d'une sous-population de cellules cancéreuses, les cellules souches de gliome (CSG). Ces cellules ont des propriétés très similaires à celles des cellules souches neurales (CSN), mais possèdent une plus forte résistance aux traitements anticancéreux ainsi qu'une capacité invasive accrue par rapport aux autres cellules cancéreuses.

Des expériences menées avant mon arrivée au laboratoire avaient mis en évidence qu'une irradiation sublétales des CSN (murines ou humaines) et des CSG était capable de stimuler la migration

et l'invasivité de ces cellules aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Dans le but de mieux comprendre quels pouvaient être les acteurs mis en jeu dans cette migration. J'ai ainsi pu participer à différentes expériences dans le but de mieux comprendre les mécanismes mise en jeu dans la migration radio-induite des CSG et d'identifier des acteurs moléculaires pouvant à plus long terme être ciblé par des traitements spécifique afin d'améliorer l'efficacité des traitements des patients atteints de glioblastomes.

Pour ce faire, nous avons utilisé différentes lignées de cellules souches de glioblastome provenant de tumeurs issues de patients (TG1N, TG16 et TG18, collaboration MP Junier et Chneiweiss, Hôpital saint Antoine) maintenues *in vitro* dans un milieu spécifique leur permettant de conserver leur caractère souche. L'analyse de la migration des CSG à l'aide de la vidéo-microscopie et de leur pouvoir invasif (chambre de Boyden) après irradiation, nous ont permis d'établir qu'une unique irradiation sublétales (jusqu'à 1,5 Gy) est capable de stimuler la migration /invasion des CSG pendant 40 heures dès 12 heures post-irradiation. Nous avons pu mettre en évidence par la mise en place de différents protocoles (Immunomarquage, inhibition pharmacologique et par siARN, RT-qPCR, dosage d'activité de promoteur) que la migration radio-induite des CSG implique une augmentation de l'expression de JMY directement stimulée par l'accumulation nucléaire du facteur de transcription HIF-1 α . De par son activité spécifique de nucléation de l'actine, JMY est capable de nucléer l'actine libre en F-actine et ainsi de stimuler la migration des CSG irradiées. Enfin, l'absence d'augmentation de la migration après irradiation de cellules de gliome préalablement différenciées à partir de CSG suggère que la voie HIF-1 α /JMY est spécifiquement liée au caractère souche des CSG. Ces résultats suggèrent que la voie HIF-1 α /JMY pourrait représenter une voie moléculaire intéressante pour le développement d'inhibiteurs spécifiques permettant à terme d'améliorer l'efficacité des traitements du gliome par l'inhibition de mécanismes moléculaires stimulant la migration des CSG au cours de la radiothérapie. Ce travail est actuellement soumis pour publication.

II. Publication

The HIF1 α /JMY pathway promotes glioblastoma stem-like cell invasiveness after irradiation

Laurent R. Gauthier, Mahasen Saati, Hayet Bensalah-Pigeon, Karim Ben M'Barek, Oscar Gitton-
Quent, Marc-André Mouthon, Marie-Pierre Junier, Hervé Chneiweiss, José R. Pineda, and François D.
Boussin

Soumis

The HIF1 α /JMY pathway promotes glioblastoma stem-like cell invasiveness after irradiation

Laurent R. Gauthier^{1,2,3,4,*}, Mahasen Saati^{1,2,3,4}, Hayet Bensalah-Pigeon^{1,2,3,4}, Karim Ben M'Barek^{1,2,3,4,5}, Oscar Gitton-Quent^{1,2,3,4}, Marc-André Mouthon^{1,2,3,4}, Marie-Pierre Junier⁶, Hervé Chneiweiss⁶, José R. Pineda^{1,2,3,4,7}, and François D. Boussin^{1,2,3,4,*}

¹ Laboratoire de Radiopathologie, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, CEA, DRF/IBFJ/iRCM, 18 route du Panorama, BP6, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

² UMR 967, INSERM, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

³ UMR 967, Université Paris VII, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

⁴ UMR 967, Université Paris XI, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

⁵ Present address: INSERM U861, I-Stem, CECS, UEVE, AFM, Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France

⁶ CNRS UMR8246, Inserm U1130, Neuroscience Paris Seine-IBPS, UPMC, Sorbonne Universités, Paris, France

⁷ Present address: Achucarro Basque Center for Neuroscience, Sede Building, E-48940 Leioa, Vizcaya, Spain

*** Corresponding authors:**

François D. Boussin and Laurent R. Gauthier

LRP- CEA/DRF/IBFJ/iRCM, 18 route du panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

Phone: (+33) 1 46 54 97 91 / 91 45

Fax: (+33) 1 46 54 91 38

E-mail: boussin@cea.fr or laurent-r.gauthier@cea.fr

Running title: Irradiation enhances glioma stem cell migration/invasion

Key words: Glioma stem cells (GSC), migration/invasion, HIF1 α , JMY, irradiation

The authors declare no potential conflicts of interest.

Abstract

Human glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive primary brain tumor with a very poor prognosis. A minor subpopulation of cancer cells, known as glioma stem-like cells (GSCs), are thought to play a major role in tumor relapse due to their stem cell-like properties, their high resistance to conventional treatments and their high invasion capacity. We show for the first time that ionizing radiation specifically enhances the motility and invasiveness of human GSCs. Mechanistically, we uncover that ionizing radiation induces the stabilization and nuclear accumulation of the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α), which in turn transcriptionally activates the Junction-mediating and regulatory protein (JMY). Finally, JMY accumulates in the cytoplasm where it stimulates GSC migration through its actin nucleation-promoting activity. Targeting JMY could thus open the way to the development of new therapeutic strategies to improve the efficacy of radiotherapy and prevent glioma recurrence.

Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive type of primary brain tumor (Davis, 2016). The standard GBM treatment includes surgical resection with adjuvant radiotherapy and chemotherapy (Stupp et al., 2005). However, the majority of patients relapse, and only 3% to 5% survive more than three years following treatment (Ostrom et al., 2014). The highly infiltrative nature of GBM is thought to contribute to tumor relapse (Lee et al., 2017).

Ionizing radiation (1 Gy - 20 Gy) has been shown to promote the migration and invasion of human glioblastoma cell lines *in vitro* (Badiga et al., 2011; De Bacco et al., 2011; Edalat et al., 2016; Hegedus et al., 2004; Kim et al., 2014; Moncharmont et al., 2014; Park et al., 2006; Rieken et al., 2012; Steinle et al., 2011; Wild-Bode et al., 2001; Zhai et al., 2006) indicating that radiation-induced migration of glioma cells may play a role in tumor relapse.

Multiple studies have shown that GBM displays intratumoral heterogeneity with a hierarchical cellular organization stemming from a minor subpopulation known as glioma stem-like cells (GSCs) (Chen et al., 2010; Kreso and Dick, 2014). GSCs share some properties with normal neural stem cells (NSCs), including the expression of specific markers, a capacity for self-renewal and the ability to give rise to differentiated cells (Ignatova et al., 2002), and they are highly tumorigenic in mice (Cheng et al., 2011). In addition, they differ from other cancer cells, both by their increased resistance to available cancer treatments and their higher invasion capacity (Bao et al., 2006; Qiu et al., 2012; Rich, 2007). GSCs are thus thought to be one of the main causes of GBM relapse following treatment (Bao et al., 2006; Reya et al., 2001).

Here, we demonstrate that ionizing radiation promotes the migration and invasiveness of human GSC lines using *in vitro* and *in vivo* assays. We show that radiation-induced migration occurs through the stabilization and nuclear accumulation of the transcription factor hypoxia-inducible factor 1 alpha

(HIF1 α), which drives the transcription of Junction-mediating and regulatory protein (JMY) (Shikama et al., 1999).

RESULTS

γ -radiation increases the migration velocity and invasive capacity of human GSCs

We used time-lapse videomicroscopy to characterize the motility patterns of three human GSC lines: TG1N, TG16 and TG18 GSC lines, which were obtained from patients with high-grade gliomas (Patru et al., 2010; Silvestre et al., 2011). Since then they were systematically cultured as tumorspheres in defined stem cell culture conditions, allowing them to keep their GSC properties i.e. expression of neural stem cell markers, capacity of differentiation, and capacity to generate intracerebral tumors in immunodeficient mice (Figure S1A).

Twenty-four hours after plating on laminin substrate, TG1N, TG16 and TG18 cells adopted a bipolar and elongated shape (Figure S1B) and displayed high motility (mean velocities of $26.3 \pm 0.6 \mu\text{m/h}$, $25.7 \pm 1.1 \mu\text{m/h}$ and $22.8 \pm 0.7 \mu\text{m/h}$, respectively) without a predefined direction (Figure S2B, Movies S1, S2 and S3), consistently with random motility pattern with high velocity previously reported for other GSC lines (Pollard et al., 2009).

We then determined the effects of different ionizing radiation doses ranging from 0 to 3 Gy on the motility pattern of TG1N and TG16 cells. In agreement with the well-known radiation-resistance of GSCs (Bao et al., 2006; Silvestre et al., 2011), quantification of activated caspase-3 and -7 in irradiated cultures by ELISA revealed minimal increases in apoptosis at 24 hours post-irradiation (PI), even at the highest dose (Table S2). Similarly, the colony formation assay revealed that only the dose of 3 Gy significantly impairs clonogenicity of TG16 cells (Figure S2). GSC migration velocity was measured over periods of 4 hours ranging from 0-28 hours PI. Migration velocity remained stable across all time periods in non-irradiated cell cultures. In contrast, migration velocity increased strikingly upon radiation in a dose-dependent manner. No increase was detected after 0.1 Gy, whereas the highest increase was observed at 8-12 hours after 3 Gy irradiation (1.34- and 1.23-fold increases for TG1N and

TG16, respectively, *** $p < 0.001$; Figure 1A). However, this effect occurred only transiently. Interestingly, we showed that 0.5 Gy induced a persistent increase in the migration velocity of the two cell lines, which remained detectable up to 52 hours PI (Figure 1B). Further experiments were thus exclusively performed at this sub-lethal dose.

At this dose, the radiation-induced increase in velocity was also observed with TG18 cells (Figure 1C). Cumulative traces and mean square displacement (MSD) measurements of cells tracked over 4 hours showed that irradiated GSCs explored a wider territory than unirradiated controls (Figure 1C and S3). However, no change in migration directionality was observed (Figure S3).

We then tested the effect of radiation on GSCs invasiveness using the Matrigel invasion chamber assay. As shown in Figure 2A, 0.5 Gy significantly increased the invasiveness of all GSC lines (TG1N: $221 \pm 41\%$; TG16: $125 \pm 11\%$; and TG18: $307 \pm 52\%$).

To further explore *in vivo* the effects of radiation on GSC invasiveness, TG1N and TG16 cells were stereotaxically injected into the striatum of adult Nude mice after 0.5 Gy radiation (Figure 2B). Serial coronal brain slices obtained two days after engraftment revealed that irradiated human nestin-positive cells exhibited a greater dispersion in the coronal plane (Figure 2C), as well as along the antero-posterior axis (Figure 2D) compared to unirradiated controls.

Altogether, our data showed that sub-lethal doses of irradiation stimulate the motility and invasiveness of GSCs isolated from GBM.

Radiation-induced migration of GSCs depends on a rapid and transient nuclear accumulation of HIF1 α .

HIF1 α has been shown to play a key role as a transcription factor in hypoxia-induced migration/invasion of several glioblastoma cell lines (Fujiwara et al., 2007; Joseph et al., 2015; Kim et al., 2014; Mendez et al., 2010; Zhang et al., 2013; Zhou et al., 2013). In normoxia, HIF1 α is hydroxylated

by prolyl hydroxylase (PHD) leading to its recognition by the von Hippel-Lindau protein and subsequent ubiquitination and targeting to the proteasome for rapid degradation (Hamanaka and Chandel, 2009). PHD destabilization under hypoxic conditions allows the accumulation of HIF1 α and its translocation to the nucleus (Chandel et al., 2000), where it forms a heterodimeric transcription factor complex with HIF1 β and binds the promoter regions of target genes (Jaakkola et al., 2001).

Interestingly, HIF1 α nuclear accumulation has been previously reported to be induced by ionizing radiation (Moeller et al., 2004). We thus determined whether HIF1 α could be involved in the radiation-induced migration/invasion of GSCs. Strikingly, we found the nuclear accumulation of HIF1 α in 70% of irradiated cells at one hour PI, compared to 12% of control cells (Figure 3A and 3B, ***p<0.001). This increase was transient, with the percentage of HIF1 α -positive cells returning to control levels at 4 hours PI (Figure 3A and 3B). Similar data were obtained through the quantification of nuclear Hif1 α intensity over time in irradiated TG1N and TG16 cells (Figure S4A and S4B).

We next showed that the irradiation-induced accumulation of HIF1 α did not involve transcriptional regulation, since HIF1 α mRNA levels estimated by RT-qPCR remained unchanged in irradiated cells compared to unirradiated controls consistently with the determinant role of post-transcriptional modifications in HIF1 α accumulation (Huang et al., 1996) (Figure S4C).

To investigate the role of HIF1 α for radiation-induced migration, we treated our cells with Deferoxamin (DFO), an iron chelator known to stabilize HIF1 α with similar kinetics to hypoxia (Wang and Semenza, 1993) and previously used to mimic hypoxia in glioma stem cells (Li et al., 2009). As shown in Figure 3A and 3B, 100 μ M DFO induced the nuclear accumulation of HIF1 α in $86 \pm 6\%$ of TG1N cells compared to $12 \pm 7\%$ of controls (***p<0.001). Further, we observed an increase in nuclear HIF1 α in DFO-treated cells compared to control cells (Figure 3C; **p<0.01). Strikingly, DFO treatment also

increased cell velocity (Figure 3D; *** $p < 0.001$), mimicking the effects of irradiation (Figure 3D). Similar data were obtained with TG16 cells (Figure S4D and S4E).

We next treated TG1N and TG16 cells with 50 μ M YC1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylyl cyclase (sGC) which blocks indirectly HIF1 α expression at the post-transcriptional level (Chun et al., 2004). This treatment inhibited the radiation-induced increase in nuclear HIF1 α (Figure 3C and S4D). Furthermore, while it had no effect on basal GSC motility, YC1 prevented the radiation-induced increase in GSC migration velocity (Figure 3D and S4E).

To conclusively demonstrate that HIF1 α was involved in radiation-induced migration of GSCs, we treated TG1N and TG16 GSCs with specific siRNAs that decreased HIF1 α mRNA expression by 88-93% (Figure S4F). HIF1 α knockdown in TG1N and TG16 cells inhibited radiation-induced migration compared to control siRNA (siCt)-transfected cells (Figure 3E and S4G).

Altogether, these data demonstrate the key role for HIF1 α in the radiation-induced GSC migration.

Stimulation of the Hif1 α /JMY pathway increases radiation-induced GSC migration

Nuclear HIF1 α is known to bind to hypoxia response elements (HRE) present in the promoters of a large number of genes (Dengler et al., 2014) ; these genes encode proteins critical for many important cellular processes, including migration (Rankin and Giaccia, 2008). Junction-mediating and regulatory protein (JMY) is one of the genes whose transcription is driven by HIF1 α under hypoxic conditions (Coutts et al., 2011), has also been reported to enhance cell motility and invasion *via* its ability to induce actin nucleation (Coutts et al., 2009; Zuchero et al., 2009).

Immunofluorescence revealed that JMY was significantly up-regulated in the cytoplasm, but not in the nucleus, of all GSC lines 24 hours after 0.5 Gy irradiation (Figure 4A and 4B). RT-qPCR showed an increase in JMY mRNA levels detectable beginning at 8 h PI and persisting thereafter (Figure 4C, S5A and S5B). Measurement of JMY promoter activity in TG1N and TG18 GSCs using luciferase assays confirmed that irradiation induced activation of the JMY promoter (Figure 4D and S5C). Interestingly, stabilizing HIF1 α levels with DFO increased the expression of JMY, whereas blocking HIF1 α with YC1 prevented the irradiation-induced increase in JMY in both TG1N and TG16 cells (Figure 4E and S5D). These results confirmed that JMY expression was dependent on HIF1 α , suggesting a tight correlation between increased HIF1 α levels, increased JMY expression and radiation-induced GSC motility.

We thus investigated the effects of JMY knockdown using a specific siRNA. JMY mRNA levels decreased by 64 and 70% in siJMY-transfected TG1N and TG16 cells, respectively, compared to siCt-transfected cells (Figure S5E). JMY knockdown did not alter the basal migration rates of TG1N (Figure 4F) and TG16 cells (Figure S5F). In contrast, it abolished the radiation-induced migration of TG1N and TG16 cells (Figure 4F and S5F).

Altogether, these results demonstrate that radiation-induced migration of GSCs is linked to the HIF1 α -dependent cytoplasmic accumulation of JMY.

The role of JMY in cell motility has been attributed to its actin nucleation-promoting activity (Coutts et al., 2011; Zuchero et al., 2009). We thus quantified F-Actin in irradiated GSCs by measuring Alexa-596 phalloidin staining. Interestingly, 24 hours after irradiation (*ie.* at the maximum of radiation-induced migration Figure 1, 3D and S4E), we showed a significant increase in F-actin cellular content in irradiated GSCs as well as in DFO-treated GSCs (Figure 5A, 5B, 5C and 5D). By contrast, HIF1 α inhibition by YC1 treatment (Figure 5B and 5D) or by siRNA (Figure 5E and 5F), as well as the knockdown of

JMY (Figure 5E and 5F), prevented this increase, concomitantly with the inhibition of the radiation-induced migration (Figure 4F and S5F).

Altogether, our data demonstrate that ionizing radiation at sublethal dose enhance the migration of human GSC *via* a HIF1/JMY pathway involving the nucleation promoting activity of JMY.

Radiation-induced migration is related to GSC stemness

We finally investigated the dynamic behavior of our different cell lines cultured under differentiating (diff) conditions (medium supplemented with 10% FBS without FGF2 and EGF) that let them loss their stem cell properties (Silvestre et al., 2011). No obvious morphological changes were observed in diffTG1N and diffTG18 cells (Figure 6A), which maintained a stable (diffTG1N) or slightly decreased (diffTG18) migration velocity compared to their parental cells (Figure 6B). In contrast, diffTG16 cells presented with a markedly flattened cytoplasm (Figure 6A) and a significant decrease in migration velocity compared to the parental GSC lines (Figure 6B).

Interestingly, ionizing radiation did not increase migration velocity (Figure 6C) nor the expression of HIF1 α (Figure 6D) and JMY (Figure 6E) in the differentiated cell lines, suggesting that the radiation-induced stimulation of cell motility is specific to GSCs due to the lack of activation of the HIF1 α /JMY pathway in differentiated cells.

DISCUSSION

GSCs are thought to play crucial roles in GBM relapse (Bao et al., 2006; Rich, 2007). Here, we report that sublethal doses of irradiation enhance the motility and invasiveness of human GSCs through HIF1 α nuclear accumulation that increases the cytoplasmic actin nucleator JMY. Our study is thus in line with previous reports showing that ionizing radiation promotes migration and invasion in various cancer cell lines (Moncharmont et al., 2014), including human glioma cell lines (Badiga et al., 2011; De Bacco et al., 2011; Edalat et al., 2016; Hegedus et al., 2004; Kim et al., 2014; Park et al., 2006; Rieken et al., 2012; Steinle et al., 2011; Wild-Bode et al., 2001; Zhai et al., 2006). However, to our knowledge, our study is the first to show not only that human GSCs are prone to this radiation effect but also that this is specifically linked to their stemness properties, as radiation did not induce this effect in “differentiated” glioma cells. This link may explain why we were able to use a much lower dose (0.5 Gy) to enhance GSC motility compared to the dose of 1 Gy (Park et al., 2006; Steinle et al., 2011; Wild-Bode et al., 2001) or greater (Badiga et al., 2011; De Bacco et al., 2011; Edalat et al., 2016; Hegedus et al., 2004; Kim et al., 2014; Rieken et al., 2012; Zhai et al., 2006) required to stimulate non-stem-like human glioma cell lines.

Previous studies have reported that hypoxia may increase the migration/invasion capacity of various glioblastoma cell lines in a HIF1 α -dependent manner (Fujiwara et al., 2007; Joseph et al., 2015; Li et al., 2013; Mendez et al., 2010; Zhang et al., 2013; Zhou et al., 2013), suggesting that HIF1 α is involved in therapeutic failure and GBM relapse (Alexandru-Abrams et al., 2014). Our study shows that the key factor linking the radiation-induced enhancement of GSCs to stem-like properties is the fact that GSCs are much more prone than differentiated cells to the activation of HIF1 α in response to radiation. This may also explain why we were able to show that 0.5 Gy enhanced the migration of GSCs, whereas Kim et al. have reported that 6 Gy-irradiation in either single or fractioned doses, but not 2 Gy irradiation,

was able to induce HIF1 α stabilization and stimulate the migration of U87 and U373 glioma cells (Kim et al., 2014).

We have shown that radiation induces the migration of GSCs through a HIF1 α -dependent cytoplasmic accumulation of JMY. JMY was initially described as a transcriptional cofactor cooperating with p300/CBP to augment p53 signaling during the DNA damage response (Coutts et al., 2007; Shikama et al., 1999). JMY has been reported to accumulate in the nucleus after exposure to ultraviolet light, etoposide and actinomycin, promoting p53-mediated apoptosis. Since TG1N and TG18, but not TG16 (El-Habr et al., 2017), are p53 proficient, the role of JMY in radiation-induced migration is not related to p53. Moreover, the ionizing radiation doses used in this study did not trigger the nuclear accumulation of JMY and induced very low levels of GSC apoptosis, suggesting that JMY does not act as a transcriptional cofactor in radiation-induced cell migration. Rather, our data show that JMY is functioning through its previously described role in cell motility under hypoxic conditions by controlling actin dynamics *via* its nucleation-promoting activity (Coutts et al., 2011; Coutts et al., 2009).

HIF1 α has been widely considered a prominent cancer drug target due to its role in the regulation of multiple survival pathways in solid hypoxic tumors. However, targeting HIF1 α is highly challenging and may induce severe side effects due its multiple functions (Hu et al., 2013; Onnis et al., 2009; Wang et al., 2017; Xia et al., 2012). In this context, specific targeting of JMY could provide new therapeutic perspectives to limit radiation-induced migration of GSCs and hence prevent tumor recurrence following radiotherapy.

MATERIALS AND METHODS

Human glioma stem-like cell (GSC) lines and treatments

The TG1N, TG16 and TG18 GSC lines were obtained from surgical resections carried out at Sainte Anne Hospital (Paris, France) on patients with high-grade gliomas according to the WHO classification (El-Habr et al., 2017; Patru et al., 2010; Silvestre et al., 2011). Since then they were systematically cultured as tumorspheres in defined stem cell culture condition (serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM/F12 supplemented with B27 without vitamin A (1X, Invitrogen), heparin (5 µg/mL, Stem Cell Technologies), human recombinant epidermal growth factor (EGF, 20 ng/ml, Sigma) and human basic fibroblast growth factor (FGF-2, 20 ng/ml, Sigma)) at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. Every week, cells were mechanically dissociated after a 10 min incubation at room temperature with the Accutase cell dissociation reagent (Sigma) and reseeded at 0.5x10⁶ cells per T75 flask.

Cells were γ-irradiated with the indicated doses 24 hours after plating using a ¹³⁷Cs irradiator (IBL637, CIS BIO International or GSR-D1, Gamma-Service Medical GmbH) or with a ⁶⁰Co medical irradiator (Alcyon). When indicated, Deferoxamine (DFO, Interchim), or YC1 (Cayman Chemical) was added 2 hours before irradiation.

Time-lapse experiments

Cells were plated on 24-well plates (25-35,000 cells /well) coated with laminin (5 µg/mL; Sigma). Videomicroscopy was carried out at least 8 hours after plating using an inverted microscope (Olympus IX81) coupled with a Coolsnap HQ camera (Princeton Instruments) controlled with Metamorph software (Universal Imaging) as previously described (Gauthier et al., 2012) or using a NIKON A1R confocal laser microscope (Nikon Corp. Tokyo). Imaging conditions were maintained at

37°C (The Box & The Cube, LIS), 5% CO₂ and 18% O₂ with a relative humidity of 95% controlled by an active gas supply system (the Brick, LIS). Images were taken of 6-20 fields per condition using a 10X objective (Olympus IX81) or in mosaic acquisition with a 20X objective (Nikon A1R) every 10 min. Tracking and overlay of individual cell tracks over a period of 4 hours were carried out using the track object function in Metamorph software (Molecular Devices) or using the MTrackJ plugin in ImageJ software. Dynamic parameters (migration velocity, mean square displacement (MSD), directionality) were calculated with an Excel macro developed by F. Cordelières (Bordeaux imaging center, UMS 3420 CNRS, France) and/or with the custom-made open-source computer program DiPer (Gorelik and Gautreau, 2014).

Cell invasion assay

Experiments were performed using Matrigel invasion chambers (BD Biosciences) as described previously (Silvestre et al., 2011). Briefly, 24 hours after irradiation (0.5 Gy), cell suspensions (2.5 x 10⁴ cells/0.5 mL) were seeded in triplicate onto the upper chamber with medium lacking growth factors (EGF and FGF). Culture medium with growth factors was added to the lower chamber. After 29 h at 37°C, adherent cells on the upper surface of the membrane were gently removed with cotton-tipped swabs, and cells invading the lower surface of the membrane were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with DAPI (1 µg/ml; Sigma). Membranes were imaged with a Nikon eclipse 50i (objective 10X/NA 0.3) and a Hamamatsu CCD ORCA-05G camera controlled by NIS-element BR V3.2 software equipped with a motorized stage. The total number of DAPI-positive nuclei per membrane was counted for each condition.

HIF1 α and JMY knockdowns

After dissociation, cells were electroporated (1300 V, 10 ms, 3 pulses) with siRNAs targeting HIF1 α (siHIF1 α , GE Healthcare), JMY (siJMY, Santa Cruz) or a negative control (siCtrl, Santa Cruz) using the Neon Transfection System (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were then plated on laminin-coated 24-well plates. Knockdown efficiency was assessed 24-48 hours after transfection by RT-qPCR.

Reverse transcription–quantitative PCR (RT-qPCR)

RNA was extracted using the RNeasy Plus Mini Kit or the RNeasy plus Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Isolated RNAs were transcribed into cDNA using the High capacity RNA to cDNA Master Mix (Applied Biosystems). Quantitative PCR reactions were performed in 96-well plates in triplicate using SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). The primers used are listed in Table S1.

Luciferase JMY reporter assay

TG1N and TG18 GSCc (15×10^3 cells) were electroporated using the Neon[®] transfection system (Thermo Fisher Scientific) with either 50 ng of the control (empty) pLightSwitch_empty_Prom vector (ref #S790005) or the pLightSwitch_Prom reporter plasmid for the JMY gene promoter (#S719700; SwitchGear Genomics), then immediately transferred in 96-well plates previously coated with laminin (5 μ g/mL; Sigma). GSCc were irradiated (0.5 Gy) 24 hours after electroporation and Luciferase reporter activity was determined at different time points using the LightSwitch Dual Assay System (SwitchGear Genomics) according to the manufacturer's instructions.

Intracerebral grafts

Swiss^{nu/nu} mice were maintained with access to food and water ad libitum in a colony room kept at a constant temperature (19°C-22°C) and humidity (40-50%) on a 12:12 h light/dark cycle. All animal-related procedures were performed in compliance with the European Communities Council Directive of September 22, 2010 (EC/2010/63) and were approved by our institutional committee on animal welfare (authorization #12-029; CEtEA-CEA DRF IdF).

Cell grafting was performed as previously described (Jeitany et al., 2015) using a stereotaxic apparatus (David Kopf model 900 Small Animal Stereotaxic Instrument). 100,000 dissociated cells (2 μ L) were inoculated into the two hemispheres using a 33G Hamilton needle (Hamilton Bonaduz) at the following coordinates: anteroposterior: +0.5 mm, dorsoventral: -3 mm and lateral: +1.5 (control cells) and -1.5 mm (irradiated cells). Forty-eight hours after grafting, animals were deeply anesthetized and intracardially perfused with 4% paraformaldehyde in PBS. Brains were removed, postfixed overnight, cryoprotected with 10% sucrose/PBS, and frozen in dry ice-cooled isopentane. A cryostat (Leica CM3050S) was used to isolate free-floating serial coronal brain sections (30 μ m) with an inter-slice spacing of 60 μ m. These sections were mounted in order to analyze the dispersion of grafted cells by immunofluorescence staining with an anti-human nestin antibody (MAB1259, 1/400; R&D Systems) as previously described (Jeitany et al., 2015; Silvestre et al., 2011). Images were acquired at 10x magnification using NIS Elements software with a Pathfinder-Nikon motorized microscope (Nikon Instruments Inc.).

GSC dispersion in the coronal plane was calculated as the sum of the surfaces in mm² occupied by human nestin-positive cells in the different coronal slices analyzed. GSC dispersion along the antero-posterior axis was calculated as the distance between the first and the last coronal slices containing human nestin-positive cells.

Immunostaining

Adherent cells were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde in PBS and then permeabilized in 0.1% Triton X-100 in PBS as previously described (Silvestre et al., 2011). Cells were then incubated with the primary antibody in blocking buffer for 1 hour at room temperature and then washed and incubated with an Alexa-conjugated secondary antibody (1/1000, Molecular Probes) and with 2 Units of AlexaFluor 594 phalloidin (Thermo Fisher scientific) per coverslip for one hour. Cells were counterstained with DAPI (1 µg/ml, Sigma) and mounted with Fluoromount (Southern Biotech). The primary antibodies used were rabbit anti-HIF1 α (NB100-449, Novus Biological), mouse anti-HIF1 α (NB100-105, Novus Biological) and MA1-516, Thermo Fisher Scientific), goat anti-JMY (L16, Santa Cruz), mouse anti-JMY (G11, Santa Cruz) and rabbit anti-JMY (M300, Santa Cruz). Images were captured using a BX51 (Olympus) coupled with a Retiga200R camera or using a Leica TCS SPE confocal microscope (Leica Microsystems). Nuclear HIF1 α , cytoplasmic JMY and F-actin mean fluorescence intensities were measured using DAPI or phalloidin staining for object segmentation with ImageJ software.

Statistical analyses

All values are reported as the mean \pm SEM. Statistical significance for two groups was assessed by the unpaired Mann-Whitney test or t-test. For comparison between more groups, a non-parametric ANOVA was performed followed by post hoc tests. Statview (Abacus Concepts) and Prism Graphpad 7.1 software programs were used. Statistical significance levels are denoted as follow: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Acknowledgements

The authors thank members of the LRP for helpful discussions. MS is the recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche. This work was supported by CEA (including a grant from Segment Radiobiologie), La Ligue contre le Cancer (Comité d'Ile de France) and Electricité de France (EDF), Inca (Tetratips, PLBIO10-030), Fondation de France (N° Engt: 2013-00042632) and Ramón y Cajal program (RYC-2013-13450).

Author contributions

LRG and MS performed videomicroscopy and qRT-PCR experiments. LRG, MS, HB, KB, OG performed cultures, immunostaining and transfection. MM and JRP performed GSC engraftments. MPJ and HC provided GSC lines. LRG and FB contributed to the conception and design, analysed/interpreted data, supervised the study and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

- Alexandru-Abrams, D., Jadus, M.R., Hsu, F.P., Stathopoulos, A., and Bota, D.A. (2014). Therapeutic targeting of malignant glioma. *Anticancer Agents Med Chem* 14, 1075-1084.
- Badiga, A.V., Chetty, C., Kesanakurti, D., Are, D., Gujrati, M., Klopfenstein, J.D., Dinh, D.H., and Rao, J.S. (2011). MMP-2 siRNA inhibits radiation-enhanced invasiveness in glioma cells. *PLoS One* 6, e20614.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756-760.
- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., and Schumacker, P.T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 275, 25130-25138.
- Chen, R., Nishimura, M.C., Bumbaca, S.M., Kharbanda, S., Forrest, W.F., Kasman, I.M., Greve, J.M., Soriano, R.H., Gilmour, L.L., Rivers, C.S., *et al.* (2010). A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 17, 362-375.
- Cheng, L., Wu, Q., Guryanova, O.A., Huang, Z., Huang, Q., Rich, J.N., and Bao, S. (2011). Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 406, 643-648.
- Chun, Y.S., Yeo, E.J., and Park, J.W. (2004). Versatile pharmacological actions of YC-1: anti-platelet to anticancer. *Cancer Lett* 207, 1-7.
- Coutts, A.S., Boulahbel, H., Graham, A., and La Thangue, N.B. (2007). Mdm2 targets the p53 transcription cofactor JMY for degradation. *EMBO Rep* 8, 84-90.
- Coutts, A.S., Pires, I.M., Weston, L., Buffa, F.M., Milani, M., Li, J.L., Harris, A.L., Hammond, E.M., and La Thangue, N.B. (2011). Hypoxia-driven cell motility reflects the interplay between JMY and HIF-1 α . *Oncogene* 30, 4835-4842.
- Coutts, A.S., Weston, L., and La Thangue, N.B. (2009). A transcription co-factor integrates cell adhesion and motility with the p53 response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19872-19877.
- Davis, M.E. (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs* 20, S2-8.
- De Bacco, F., Luraghi, P., Medico, E., Reato, G., Girolami, F., Perera, T., Gabriele, P., Comoglio, P.M., and Boccaccio, C. (2011). Induction of MET by ionizing radiation and its role in radioresistance and invasive growth of cancer. *J Natl Cancer Inst* 103, 645-661.
- Dengler, V.L., Galbraith, M., and Espinosa, J.M. (2014). Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49, 1-15.
- Edalat, L., Stegen, B., Klumpp, L., Haehl, E., Schilbach, K., Lukowski, R., Kuhnle, M., Bernhardt, G., Buschauer, A., Zips, D., *et al.* (2016). BK K⁺ channel blockade inhibits radiation-induced migration/brain infiltration of glioblastoma cells. *Oncotarget* 7, 14259-14278.
- El-Habr, E.A., Dubois, L.G., Burel-Vandenbos, F., Bogeas, A., Lipecka, J., Turchi, L., Lejeune, F.X., Coehlo, P.L., Yamaki, T., Wittmann, B.M., *et al.* (2017). A driver role for GABA metabolism in controlling stem and proliferative cell state through GHB production in glioma. *Acta Neuropathol* 133, 645-660.
- Fujiwara, S., Nakagawa, K., Harada, H., Nagato, S., Furukawa, K., Teraoka, M., Seno, T., Oka, K., Iwata, S., and Ohnishi, T. (2007). Silencing hypoxia-inducible factor-1 α inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. *Int J Oncol* 30, 793-802.
- Gauthier, L.R., Granotier, C., Hoffschir, F., Etienne, O., Ayoub, A., Desmaze, C., Mailliet, P., Biard, D.S., and Boussin, F.D. (2012). Rad51 and DNA-PKcs are involved in the generation of specific telomere aberrations induced by the quadruplex ligand 360A that impair mitotic cell progression and lead to cell death. *Cell Mol Life Sci* 69, 629-640.

Gorelik, R., and Gautreau, A. (2014). Quantitative and unbiased analysis of directional persistence in cell migration. *Nat Protoc* 9, 1931-1943.

Hamanaka, R.B., and Chandel, N.S. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol* 21, 894-899.

Hegedus, B., Zach, J., Czirok, A., Lovey, J., and Vicsek, T. (2004). Irradiation and Taxol treatment result in non-monotonous, dose-dependent changes in the motility of glioblastoma cells. *J Neurooncol* 67, 147-157.

Hu, Y., Liu, J., and Huang, H. (2013). Recent agents targeting HIF-1alpha for cancer therapy. *J Cell Biochem* 114, 498-509.

Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., and Bunn, H.F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 271, 32253-32259.

Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., and Steindler, D.A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39, 193-206.

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., *et al.* (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.

Jeitany, M., Pineda, J.R., Liu, Q., Porreca, R.M., Hoffschir, F., Desmaze, C., Silvestre, D.C., Mailliet, P., Junier, M.P., Londono-Vallejo, A., *et al.* (2015). A preclinical mouse model of glioma with an alternative mechanism of telomere maintenance (ALT). *Int J Cancer* 136, 1546-1558.

Joseph, J.V., Conroy, S., Pavlov, K., Sontakke, P., Tomar, T., Eggens-Meijer, E., Balasubramaniyan, V., Wagemakers, M., den Dunnen, W.F., and Kruyt, F.A. (2015). Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1alpha-ZEB1 axis. *Cancer Lett* 359, 107-116.

Kim, Y.H., Yoo, K.C., Cui, Y.H., Uddin, N., Lim, E.J., Kim, M.J., Nam, S.Y., Kim, I.G., Suh, Y., and Lee, S.J. (2014). Radiation promotes malignant progression of glioma cells through HIF-1alpha stabilization. *Cancer Lett* 354, 132-141.

Kreso, A., and Dick, J.E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 14, 275-291.

Lee, S.Y., Jeong, E.K., Ju, M.K., Jeon, H.M., Kim, M.Y., Kim, C.H., Park, H.G., Han, S.I., and Kang, H.S. (2017). Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Mol Cancer* 16, 10.

Li, P., Zhou, C., Xu, L., and Xiao, H. (2013). Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study. *Int J Med Sci* 10, 399-407.

Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., *et al.* (2009). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 15, 501-513.

Mendez, O., Zavadil, J., Esencay, M., Lukyanov, Y., Santovasi, D., Wang, S.C., Newcomb, E.W., and Zagzag, D. (2010). Knock down of HIF-1alpha in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres. *Mol Cancer* 9, 133.

Moeller, B.J., Cao, Y., Li, C.Y., and Dewhirst, M.W. (2004). Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 5, 429-441.

Moncharmont, C., Levy, A., Guy, J.B., Falk, A.T., Guilbert, M., Trone, J.C., Alphonse, G., Gilormini, M., Ardail, D., Toillon, R.A., *et al.* (2014). Radiation-enhanced cell migration/invasion process: a review. *Crit Rev Oncol Hematol* 92, 133-142.

Munshi, A., Hobbs, M., and Meyn, R.E. (2005). Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med* 110, 21-28.

Onnis, B., Rapisarda, A., and Melillo, G. (2009). Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy. *J Cell Mol Med* 13, 2780-2786.

Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., *et al.* (2014). The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol* 16, 896-913.

Park, C.M., Park, M.J., Kwak, H.J., Lee, H.C., Kim, M.S., Lee, S.H., Park, I.C., Rhee, C.H., and Hong, S.I. (2006). Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Cancer Res* 66, 8511-8519.

Patru, C., Romao, L., Varlet, P., Coulombel, L., Raponi, E., Cadusseau, J., Renault-Mihara, F., Thirant, C., Leonard, N., Berhneim, A., *et al.* (2010). CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glioma neuronal tumors. *BMC Cancer* 10, 66.

Pollard, S.M., Yoshikawa, K., Clarke, I.D., Danovi, D., Stricker, S., Russell, R., Bayani, J., Head, R., Lee, M., Bernstein, M., *et al.* (2009). Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 4, 568-580.

Qiu, B., Zhang, D., Tao, J., Tie, X., Wu, A., and Wang, Y. (2012). Human brain glioma stem cells are more invasive than their differentiated progeny cells in vitro. *J Clin Neurosci* 19, 130-134.

Rankin, E.B., and Giaccia, A.J. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 15, 678-685.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.

Rich, J.N. (2007). Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res* 67, 8980-8984.

Rieken, S., Habermehl, D., Wuerth, L., Brons, S., Mohr, A., Lindel, K., Weber, K., Haberer, T., Debus, J., and Combs, S.E. (2012). Carbon ion irradiation inhibits glioma cell migration through downregulation of integrin expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 83, 394-399.

Shikama, N., Lee, C.W., France, S., Delavaine, L., Lyon, J., Krstic-Demonacos, M., and La Thangue, N.B. (1999). A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. *Mol Cell* 4, 365-376.

Silvestre, D.C., Pineda, J.R., Hoffschir, F., Studler, J.M., Mouthon, M.A., Pflumio, F., Junier, M.P., Chneiweiss, H., and Boussin, F.D. (2011). Alternative lengthening of telomeres in human glioma stem cells. *Stem Cells* 29, 440-451.

Steinle, M., Palme, D., Misovic, M., Rudner, J., Dittmann, K., Lukowski, R., Ruth, P., and Huber, S.M. (2011). Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K(+) channels. *Radiother Oncol* 101, 122-126.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., *et al.* (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987-996.

Wang, G., Wang, J.J., Fu, X.L., Guang, R., and To, S.T. (2017). Advances in the targeting of HIF-1 α and future therapeutic strategies for glioblastoma multiforme (Review). *Oncol Rep* 37, 657-670.

Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1993). Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82, 3610-3615.

Wild-Bode, C., Weller, M., Rimner, A., Dichgans, J., and Wick, W. (2001). Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res* 61, 2744-2750.

Xia, Y., Choi, H.K., and Lee, K. (2012). Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *Eur J Med Chem* 49, 24-40.

Zhai, G.G., Malhotra, R., Delaney, M., Latham, D., Nestler, U., Zhang, M., Mukherjee, N., Song, Q., Robe, P., and Chakravarti, A. (2006). Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via activation of the Rho signaling pathway. *J Neurooncol* 76, 227-237.

Zhang, Y., Liu, Q., Wang, F., Ling, E.A., Liu, S., Wang, L., Yang, Y., Yao, L., Chen, X., Wang, F., *et al.* (2013). Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1alpha. *J Pineal Res* 55, 121-130.

Zhou, X., Liu, Z., Shi, Q., Jiao, J., Bian, W., Song, X., Mo, J., Sang, B., Xu, Y., Qian, J., *et al.* (2013). Geranylgeranyltransferase I regulates HIF-1alpha promoting glioblastoma cell migration and invasion. *J Neurooncol* 112, 365-374.

Zuchero, J.B., Coutts, A.S., Quinlan, M.E., Thangue, N.B., and Mullins, R.D. (2009). p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat Cell Biol* 11, 451-459.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: γ -irradiation stimulates the migration of GSCs

A Dose-dependent effects of radiation on the migration of TG1N and TG16 GSCs. Cell motility was monitored between 4 and 28 hours post-irradiation for successive 4-hour periods by videomicroscopy. Graphs show the effects of radiation on cell migration expressed as percentages of the respective unirradiated controls for the indicated period of time after irradiation. The mean migration of TG1N and TG16 GSCs were calculated from at least 120 cells (TG1N) and 80 cells (TG16).

B Effects of 0.5 Gy irradiation on the migration of human TG1N (left) and TG16 cells (right). GSCs were irradiated 24 hours after plating. At least 80 cells (TG1N) and 90 cells (TG16) were tracked every ten minutes over the course of 124 hours for each period of 4 hours. Histograms show the effects of radiation on cell migration expressed as percentages of the respective unirradiated controls during the indicated periods of time after irradiation.

C Mean migration velocity and cumulative traces of control and irradiated (0.5 Gy) TG1N, TG16 and TG18 cells twenty-four hours after 0.5 Gy irradiation. Histograms on the left show the mean velocities of irradiated cells and non-irradiated controls (calculated from at least 75 cells per line). Graphs on the right show the color traces representing the tracking of 50 individual irradiated cells and non-irradiated controls.

Figure 2

Irradiation increases the invasiveness of GSCs *in vitro* and *in vivo*.

A Boyden chambers were used to measure invasiveness of GSCs (TG1N, TG16 and TG18) 29 hours after 0.5 Gy irradiation. The results are expressed as percentages of non-irradiated controls (n = 5 per group from 3 independent experiments).

B Human nestin immunostaining (arrows) of coronal slices of brains of nude mice 48 hours after striatal grafting of unirradiated (left) or irradiated (0.5 Gy, right) TG1N (upper panel) or TG16 (lower panel).

C,D Quantification of human nestin-positive cells dispersion in the coronal plane (C) and along the antero-posterior axis (D) of unirradiated and irradiated TG1N and TG16 cells (n = 3-5 brain per condition).

Figure 3

A rapid and transient nuclear accumulation of HIF1 α is involved in radiation-induced migration of GSCs

A Immunostaining of HIF1 α in DFO-treated (100 μ M, one hour) or irradiated (0.5 Gy 1 or 4 hours PI) TG1N GSCs. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar: 100 μ m.

B Percentage of intranuclear HIF1 α -positive cells after DFO treatment or after (0.5 Gy) irradiation (n = 100 cells per condition).

C YC1 (50 μ M) treatment 1 hour prior to irradiation (0.5Gy) prevented the radiation-induced nuclear accumulation of HIF1 α in TG1N GSCs. One hour after irradiation or DFO treatment (100 μ M), nuclear HIF1 α fluorescence intensity was determined in at least 50 cells per condition.

D Effects of YC1 or DFO treatments on TG1N GSCs migration velocity 24 hours PI. Migration velocity was expressed as percentages of the unirradiated control and calculated from at least 80 cells for each condition.

E HIF1 α knockdown prevented the radiation-induced migration of TG1N cells. TG1N GSCs were transfected with a siRNA targeting HIF1 α (siHIF1 α) or a scramble control (siCt) and irradiated (0.5 Gy)

24 hours later. Twenty-four hours after irradiation, migration velocity was determined and expressed as percentage of the unirradiated control. Data were obtained from at least 70 cells per condition.

Figure 4

The HIF1 α /JMY pathway is involved in radiation-induced migration of GSCs

A JMY immunostaining (white) of GSCs 24 hours after 0 Gy or 0.5 Gy irradiation. F-actin filament networks are stained with fluorescent-phalloidin (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 20 μ m.

B Quantification of JMY fluorescence intensity. At least 20 cells were scored per condition.

C Quantification of JMY mRNA levels by RT-qPCR in TG1N cells. Experiments were performed in triplicate.

D JMY promoter activity in TG1N cells was estimated by luciferase reporter assay at different times following irradiation (0.5 Gy).

E TG1N cells were treated with 50 μ M YC1 one hour before irradiation (0.5 Gy). Immunostainings were performed 24 hours after irradiation or after treatment with 100 μ M DFO. JMY-fluorescence intensity was measured (n = 30 cells per condition).

F TG1N cells were transfected with siJMY or siCt and irradiated (0.5 Gy) 24 hours later. Twenty-four hours after irradiation, cells were tracked every ten minutes over the course of 4 hours. Data were obtained from at least 65 cells per condition. The results are expressed as percentages of unirradiated TG1N cells transfected with siCt.

Figure 5.

Irradiation increases cellular levels of F-actin in a JMY-dependent manner.

A,C F-actin staining with phalloidin in TG1N (A) or in TG16 (C) GSCs. Scale bars: 20 μ M (A) and 10 μ M (C).

B,D Quantification of phalloidin fluorescence intensity 24 hours after 0.5 Gy irradiation (in cells pretreated or not with 50 μ M YC1) or after 100 μ M DFO for TG1N (B) and TG16 GSCs (D). At least 35 cells were scored per condition.

E,F Quantification of F-actin fluorescence intensity staining by phalloidin after irradiation (0.5 Gy) or not in GSCs with siCt, siJMY or siHIF1 α - electroporated TG1N (E) and TG16 (F). At least 20 and 25 cells were scored by condition (respectively in TG1N and TG16 GSCs)

Figure 6.

Radiation-induced migration is related to stemness.

A Typical microscopic phase contrast pictures of differentiated cancer cells plated on a laminin substrate. Scale bar: 50 μ M

B Differentiation markedly reduced the motility of TG16 cells. The mean migration velocities of GSCs (Undiff) and differentiated cancer cells (Diff) were calculated from at least 75 cells per group 24 hours after plating.

C Irradiation did not enhance the migration of differentiated cancer cells. Cells were tracked 24 hours after irradiation (0.5 Gy) every ten minutes over the course of 4 hours. The mean migration velocities of control (0 Gy) and irradiated cells was calculated from at least 120 cells per group tracked every ten minutes over the course of 4 hours.

D Irradiation did not increase nuclear expression of HIF1 α in differentiated cells. Immunostainings were performed 1 hour after irradiation (0.5 Gy). Nuclear HIF1 α fluorescence intensity was measured in at least 50 cells per condition.

E Irradiation did not increase JMY expression in differentiated cells. Immunostainings were performed 24 hours after irradiation (0.5 Gy). JMY fluorescence intensity was measured in at least 65 cells per condition

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1.

TG1N, TG16 and TG18 have the capacity to generate intracerebral tumors in nude mice and have a high velocity cultured on Laminin substrate

A Representative engraftments of luciferase-expressing GSCs (10^5 cells) into the striatum of Swiss Nu/Nu mice. GSC cells were transduced using a lentiviral vector containing a Luciferase cassette (pTRIP-MND-Luciferase-Ires-GFP) and grafted (10^5 cells) into the striatum of female Swiss Nu/Nu mice. Tumor growth was followed after D-Luciferin administration using an IVIS Lumina III In Vivo Imaging System (PerkinElmer). Tumor formation was observed in all GSCs grafted mice ($n \geq 3$ for each GSC line).

B Typical microscopic phase contrast pictures of the different GSC lines 24 hours after plating on a laminin substrate. Contrary to TG1 and TG18 GSCs that mainly adopted a bipolar and elongated shape (Supplementary video 1 and 2), TG16 GSCs were morphologically heterogeneous forming two distinct populations with a majority of bipolar and elongated flattened shape cells and a minority of spherical and blebbing morphology cells ($34.3 \pm 1.6\%$, white arrow). Importantly, TG16 GSCs could alternate between these two distinct morphologies (Supplementary Video 3). Scale bar: 50 μ M

C Mean migration velocity of bipolar/elongated cells and blebbing GSCs derived from GBM (TG1N, TG18 and TG16) plated on laminin substrate. The mean velocity of TG16 bipolar cells was similar to that of TG1N and TG18 cells whereas TG16 blebbing cells migrated at a significantly slower velocity than their respective bipolar counterparts ($14.15 \pm 0.9 \mu\text{m/h}$, *** $p < 0.001$). TG16 bipolar cells migrated with no predefined direction, in a manner similar to TG1N and TG18 cells (Supplementary Video 3). Further analyses were thus only performed on the bipolar elongated sub-population. Human GSCs adopt a random motility pattern with a high velocity on laminin substrates. For each cell line, at least 70 cells were tracked every ten minutes over the course of 4 hours.

Figure S2.

Effects of ionizing radiation on TG16 clonogenicity.

A Representative images of clonogenicity assay. Briefly, TG16 cells were plated in 6-well plates at 300 cells/well and irradiated (0 to 3 Gy) 24 hours later then switched to fresh media and allowed to grow for 13 days. They were then fixed in acetic acid/methanol (1:7) and stained with crystal violet.

B Colonies were counted to determine the plating efficiency for each dose (PE = number of colonies formed/number of seeded cells x 100). Plating efficiencies were expressed as mean \pm SEM from three experiments (*P<0.05).

C The surviving fraction for each dose is the ratio of PE of irradiated sample / PE of unirradiated control(Munshi et al., 2005). Data were expressed as mean \pm SEM obtained in three experiments (*P<0.05).

Figure S3.

Irradiated GSCs explore a wider territory without alteration of their migration directionality.

The mean square displacement and directionality obtained from the tracking of individual unirradiated and irradiated GSCs 24 hours after γ -irradiation (0.5 Gy) over 240 min of observation. In each graph on the left, blue and red lines represent the MSDs of control GSC and irradiated cells, respectively. In the graphs on the right, white and black bars represent control and irradiated GSCs, respectively (0.5 Gy, 24 hours PI). Depending on the cell line, between 82 and 219 cells were scored.

Figure S4.

Nuclear accumulation of HIF1 α is involved in radiation-induced migration of GSCs.

A,B Quantification of nuclear HIF1 α fluorescence intensity in irradiated (0.5 Gy) TG1N cells (A) and irradiated (0.5 Gy) TG16 cells (B) over time (n = 50 cells per time-point).

C RT-qPCR quantification of HIF1 α mRNA in TG1N cells at different times after irradiation (0.5 Gy).

D YC1 prevents the radiation-induced nuclear accumulation of HIF1 α in TG16 cells. TG16 cells were either treated with 50 μ M YC1 and irradiated 1 hour later or treated with 100 μ M DFO (F). After 1 hour, nuclear HIF1 α fluorescence intensity was measured in at least 50 cells per condition.

E YC1 prevents the radiation-induced cytoplasmic accumulation of JMY, while DFO stimulates the cytoplasmic accumulation of JMY. TG16 cells were treated with 50 μ M YC1 one hour before irradiation (0.5 Gy). Migration velocity was measured 24 hours after irradiation or after treatment with 100 μ M DFO (n = 120 cells per condition).

F mRNA levels of HIF1 α in TG1N cells (left panel) and TG16 cells (right panel) transfected with a siRNA targeting HIF1 α (siHIF1 α) or a scrambled control siRNA (siCt).

G Migration velocity of TG16 cells transfected with siHIF1 α or siCt 24 hours after 0 or 0.5 Gy irradiation (n = 100 cells per condition).

Figure S5.

JMY pathway is involved in radiation-induced migration of GSCs.

A,B JMY mRNA levels in TG16 cells (a) and TG18 cells (b) at different times after irradiation (0.5 Gy).

C JMY promoter activity estimated by a luciferase reporter assay in TG18 cells.

D JMY fluorescence intensity in TG16 cells: unirradiated (non irr), irradiated (one hour PI at 0.5 Gy), pretreated with YC1 (50 μ M) and irradiated (one hour PI at 0.5 Gy), and treated one hour with DFO (100 μ M) (n = 28 cells per condition).

E RT-qPCR quantification of JMY mRNA levels in TG1N and TG16 cells transfected with siCt or siJMY.

F Migration velocity of TG16 cells electroporated with a siRNA targeting JMY (siJMY) or a scrambled control siRNA 24 hours after irradiation (0.5 Gy). (n = 92 cells per condition).

Table S1: Primers used for quantitative Real-Time PCR

Primers	Couple	Sequences
HIF1α	F1-60	Sens : TGCAACATGGAAGGTATTGCAC
	R1-61	Antisens : GCACCAAGCAGGTCATAGGT
JMY	F3-68	Sens : GCCAAGAGAGACAGAGAAC
	R3-69	Antisens : GCATGAGCTAGTCGTAATC
GUS	F2-96	Sens : ACCTCCAAGTATCCCAAGG
	R2-97	Antisens : ACAGAAGTACAGACCGCTG

Table S2: Apoptosis 24 hours PI in GSCs is not significant until the irradiation dose of 1.5 Gy.

Fold induction of Caspase 3/7 in irradiated GSCs 24 hours PI (0.5 Gy) was measured using the Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay according to the manufacturer's instructions.

	0 Gy	0,5 Gy	1,5 Gy	3 Gy
TG1N	1.00 ± 0.01	1.09 ± 0.01	1.07 ± 0.04	1.15 ± 0.01 **
TG16	1.00 ± 0.01	1.10 ± 0.02	1.10 ± 0.03	1.13 ± 0.01
TG18	1.00 ± 0.01	1.04 ± 0.01	1.06 ± 0.02	1.07 ± 0.03*

Movies S1, S2 and S3: Dynamics of TG1N (Movies S1), TG16 (Movies S2) and TG18 (Movies S3) over time.

Each video was recorded using a NIKON A1R confocal laser microscope twenty-four hours after plating cells on a laminin substrate. Images were taken in mosaic acquisition mode with a 20X objective every 10 min over the course of 240 minutes. Video editing was performed with ImageJ software and saved in AVI format at a frame rate of 10 fps.

FIGURES

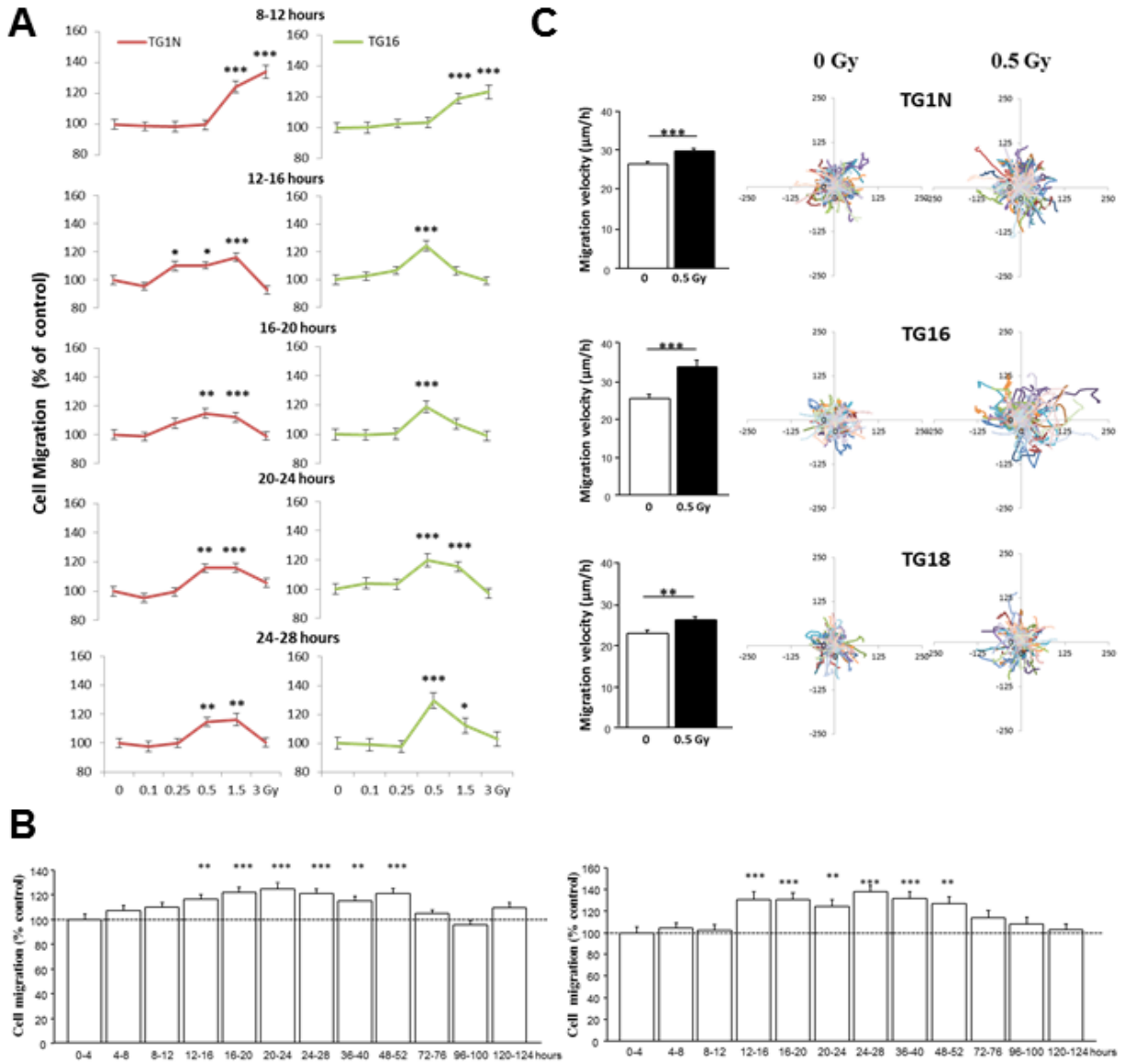


Figure 1

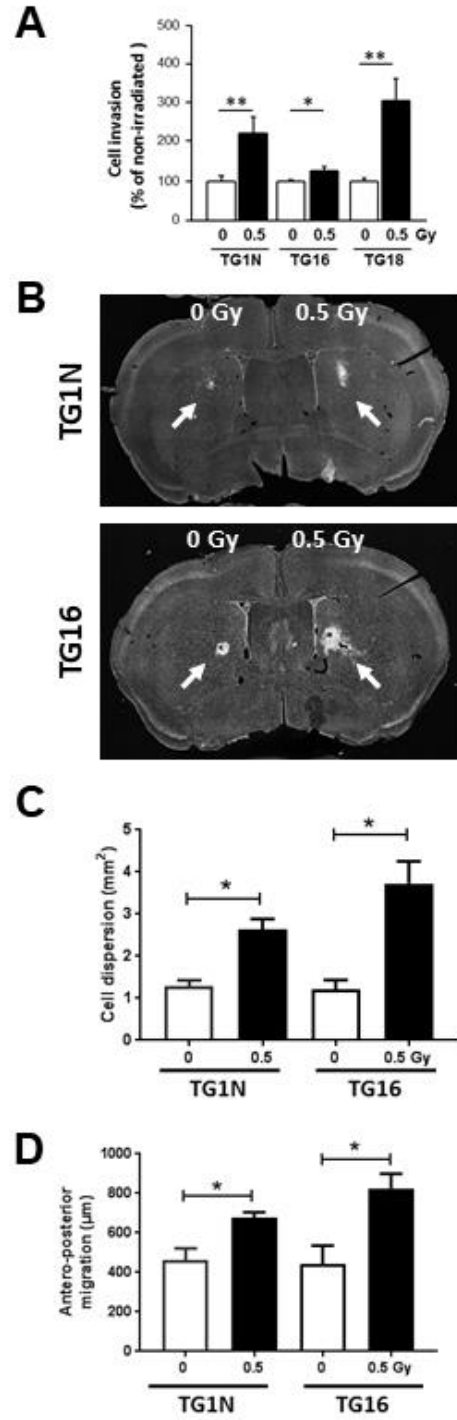


Figure 2

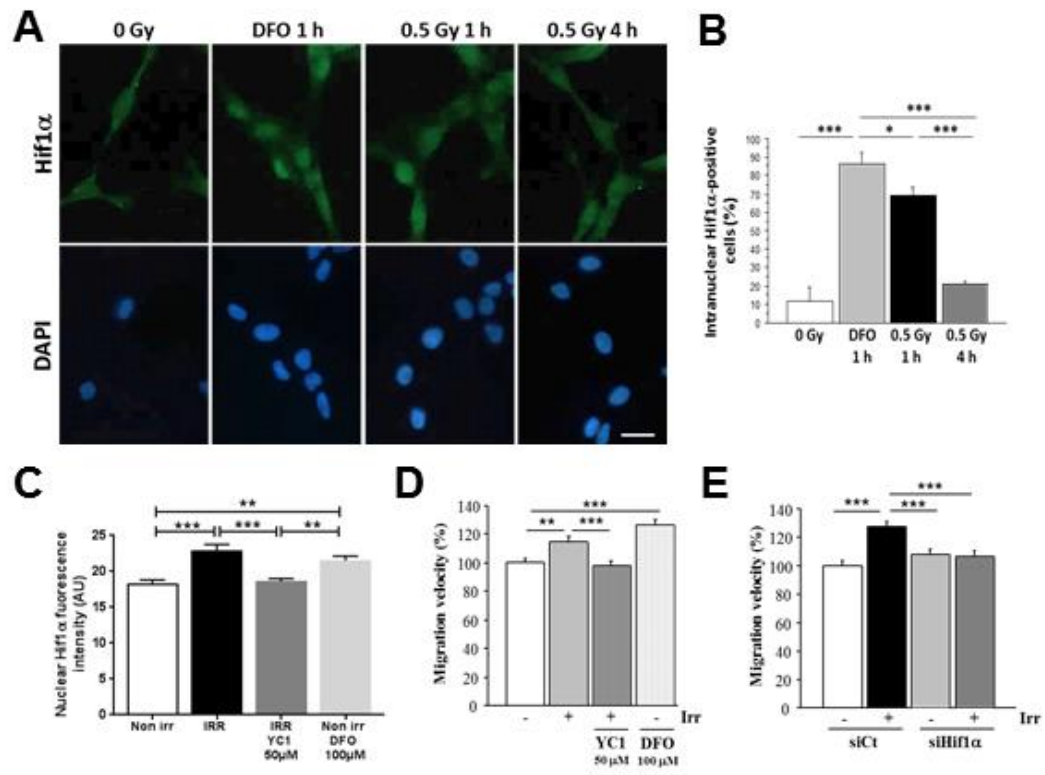


Figure 3

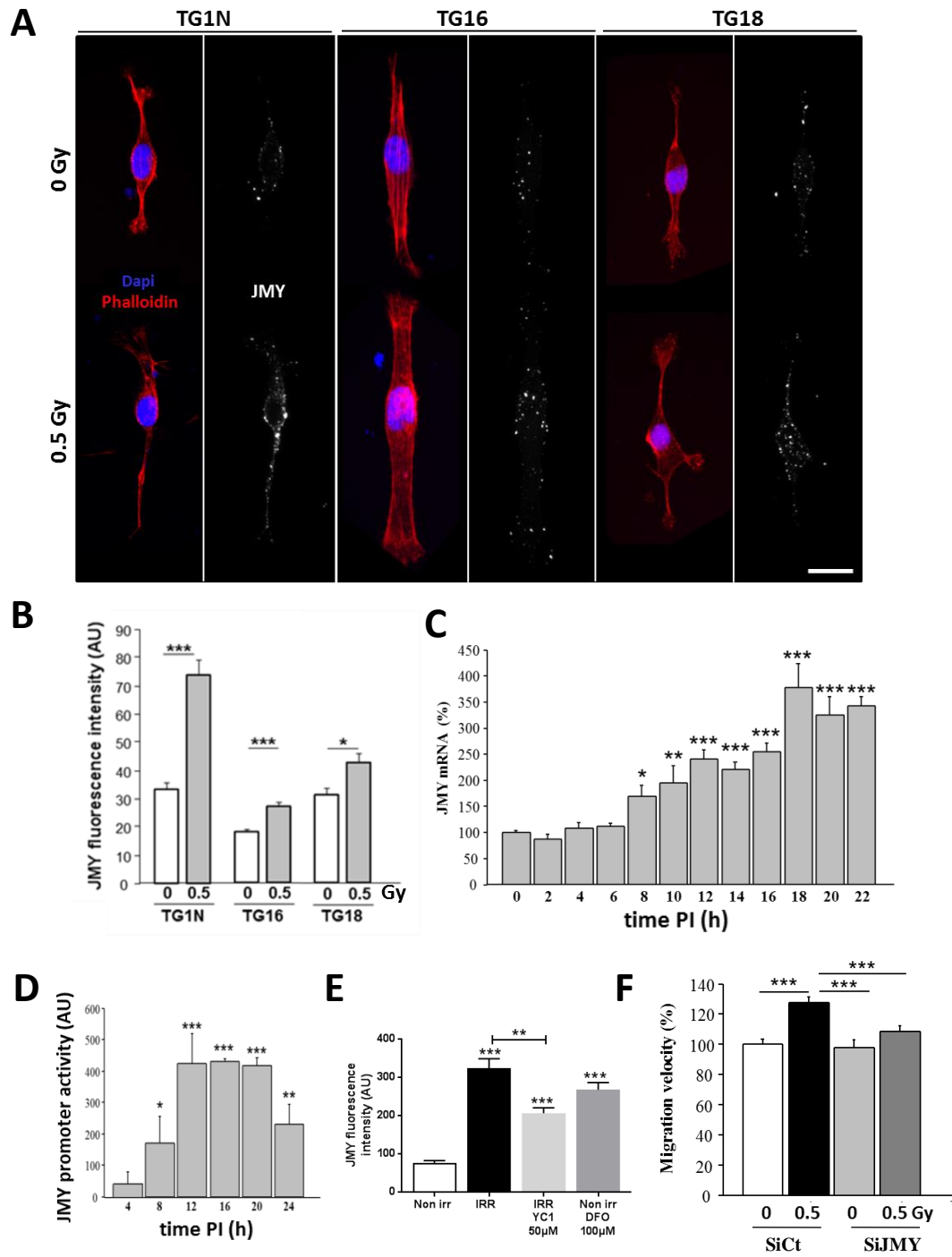


Figure 4

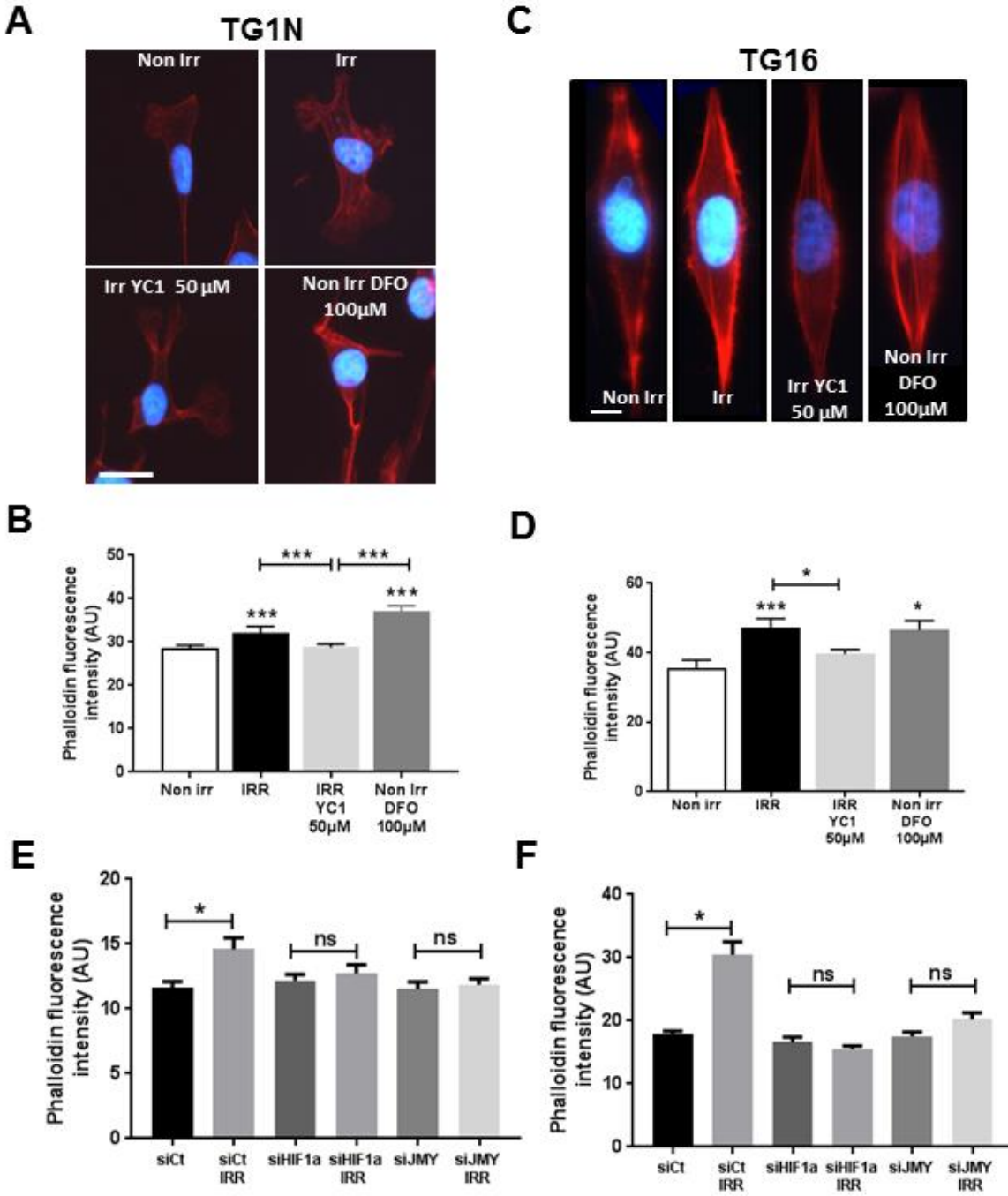


Figure 5

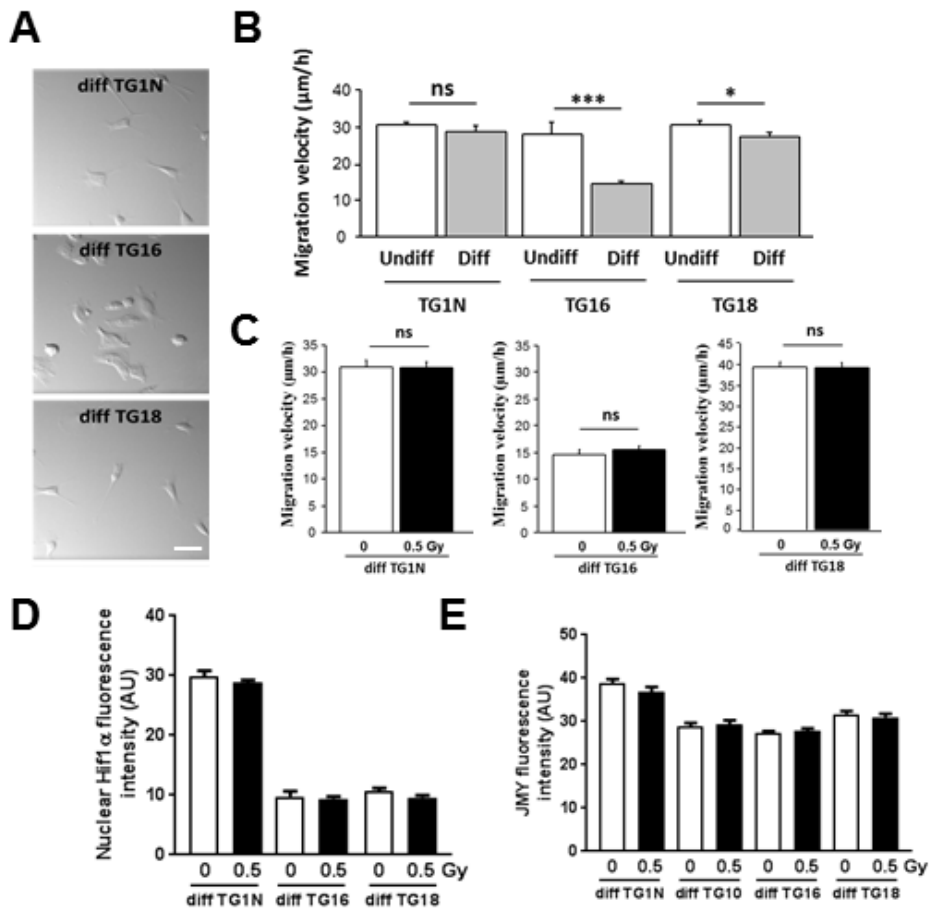


Figure 6

SUPPLEMENTAL FIGURES

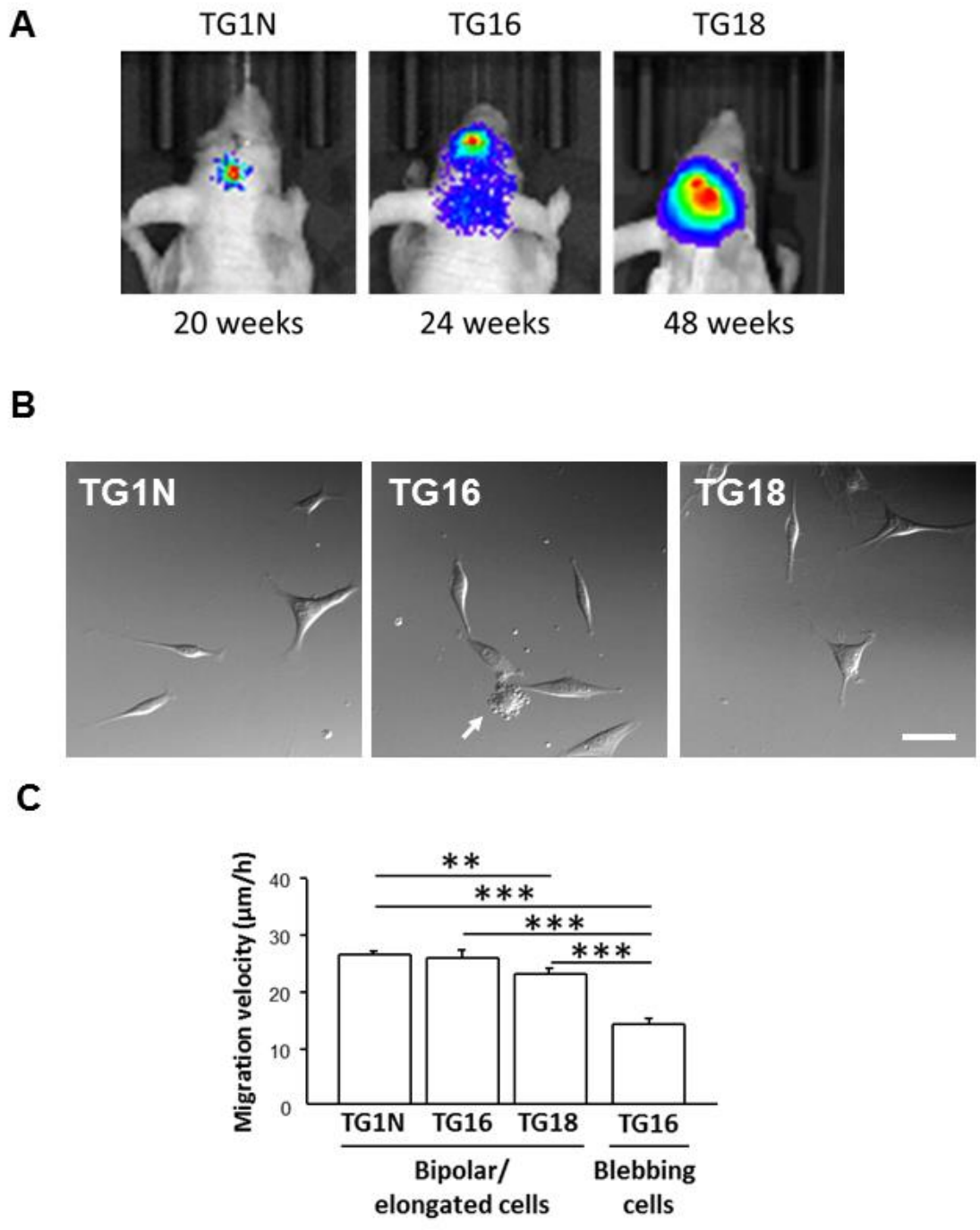


Figure S1

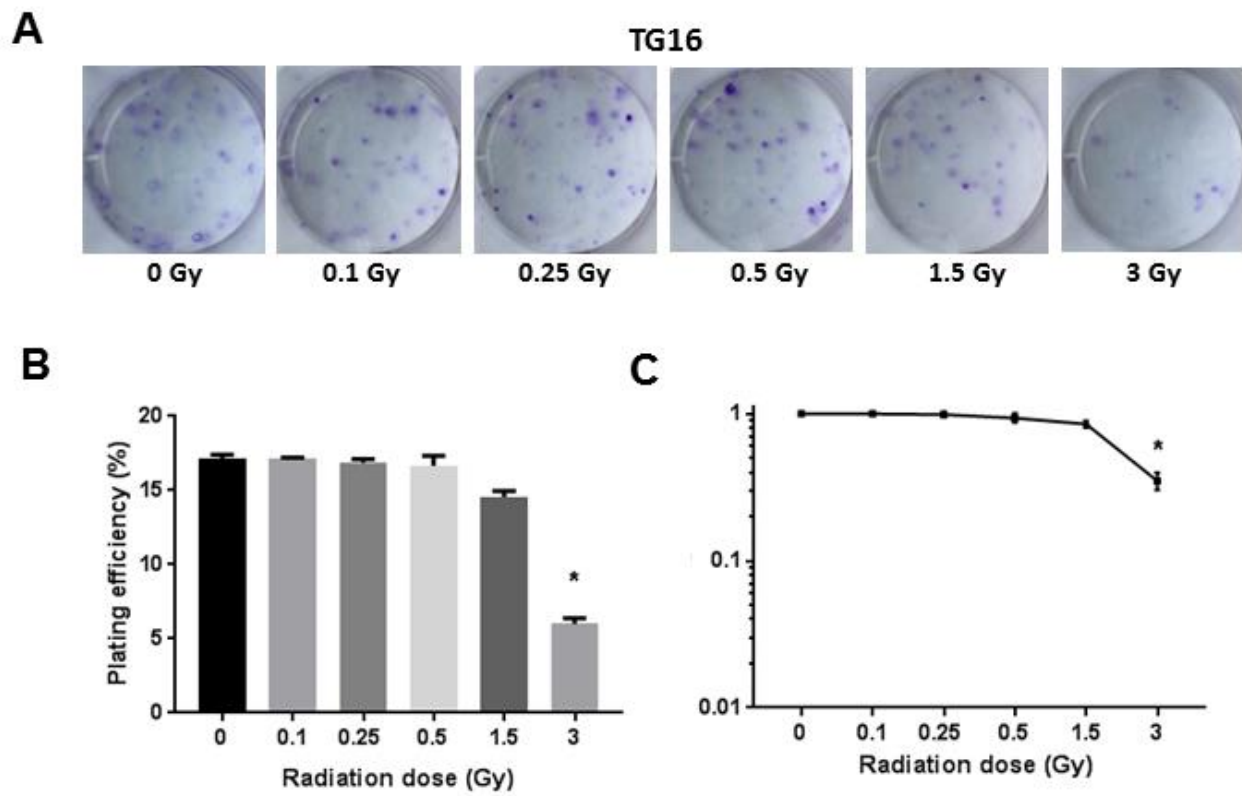


Figure S2

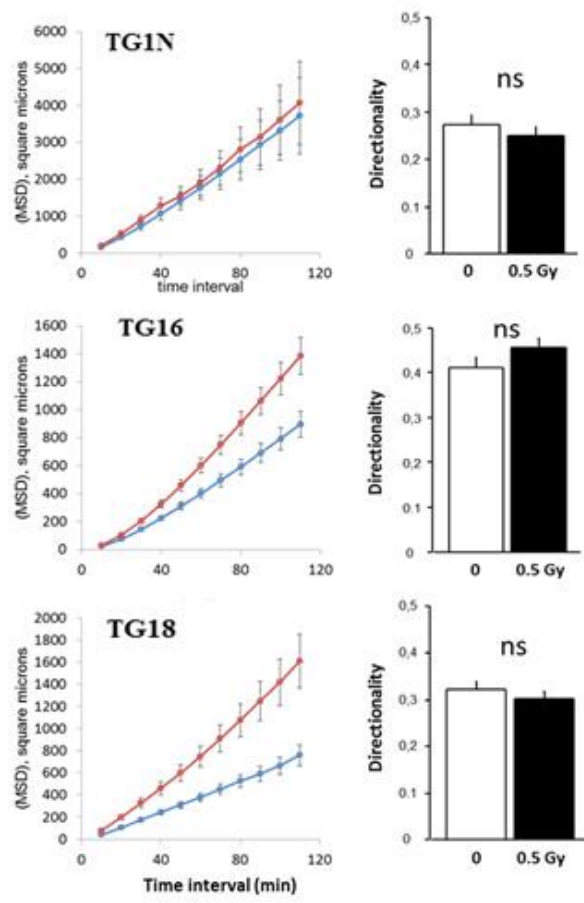


Figure S3

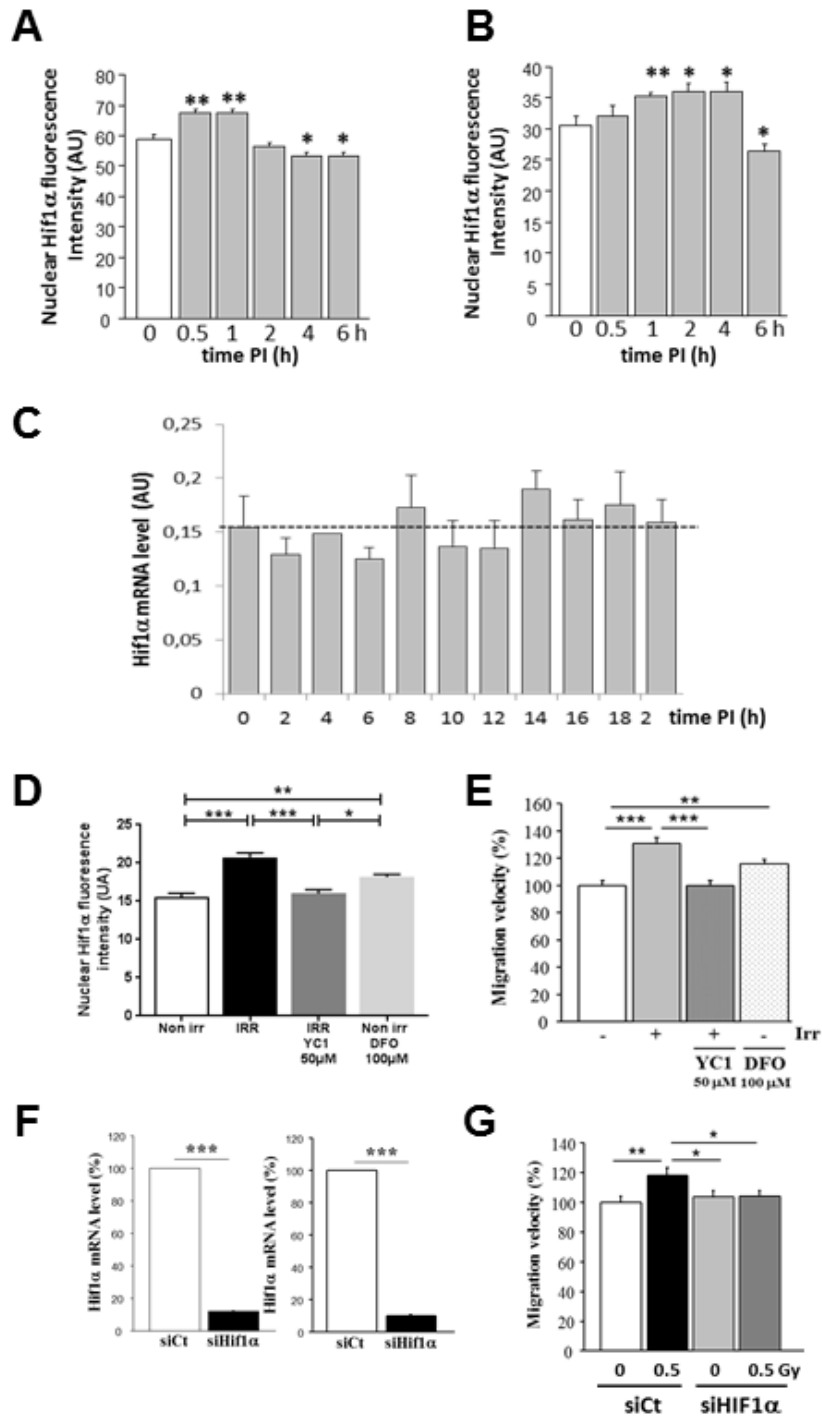


Figure S4

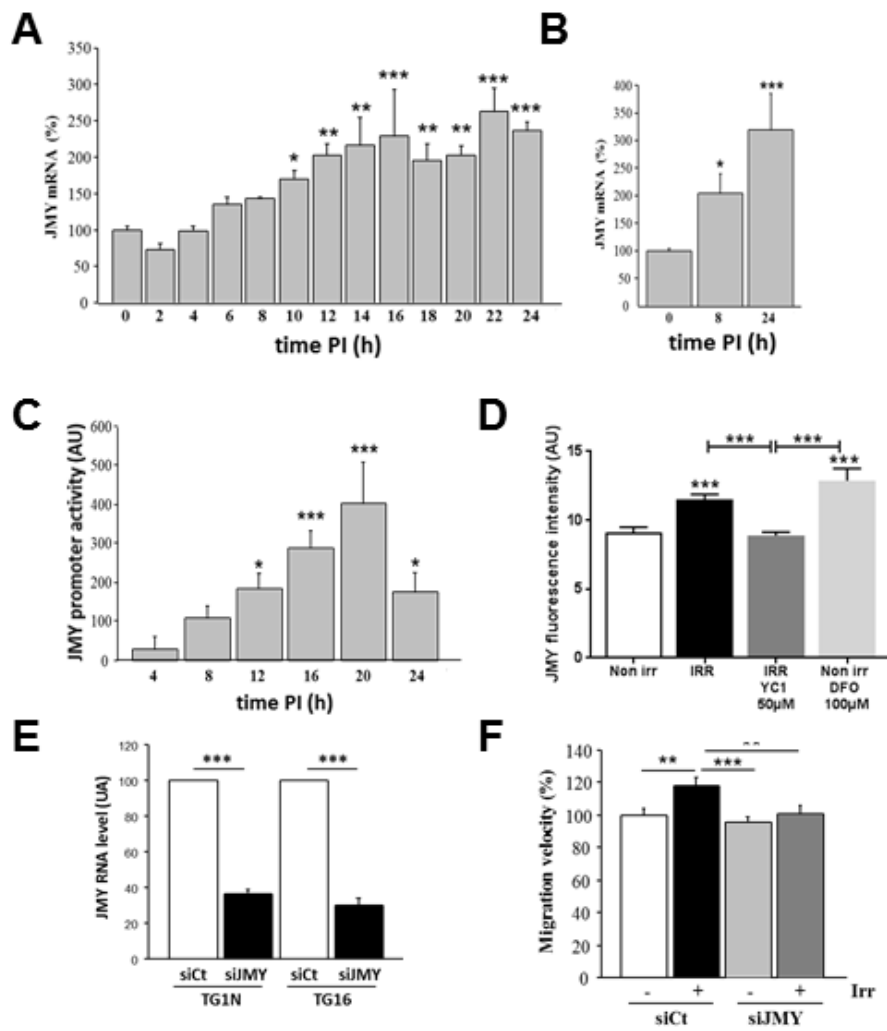


Figure S5

III. Résultats complémentaires

Puisque nos précédents résultats mettent en évidence que la migration radio-induite est spécifique du caractère souche des cellules, nous avons recherché à déterminer si une irradiation de ce type pouvait avoir un effet stimulant sur la migration/invasion des cellules souches neurales (CSN). En effet, il est établi que les CSG partagent avec les CSN des propriétés comparables comme la capacité à s'autorenouveler et la multi-potence qui peuvent s'expliquer par des profils transcriptomiques similaires et un certain nombre de voies moléculaires communes nécessaires entre autres, au maintien de leurs propriétés d'autorenouvellement (Gangemi et coll., 2009).

1. Impact d'une irradiation sublétale sur la migration/invasion des cellules souches neurales

1.1. Une irradiation de 0,5 Gy stimule la migration *in vitro* des CSN embryonnaires humaines et murines

Des études menées au laboratoire ont mis en évidence qu'une irradiation de 0,5 Gy provoque après 24 heures, une augmentation significative de la vitesse de migration (**p<0.001, Figure 1A) des CSN embryonnaires humaines sur un substrat laminine (identique à celui utilisé pour les tests de migration des CSG) et maintenues dans un milieu favorisant leur non différenciation (EGF + FGF). Cette migration radio-induite a également été observée dans les mêmes conditions expérimentales (0,5 Gy, 24 heures post irradiation) dans des cultures de CSN provenant de cerveaux embryonnaires de souris (Figure 1B, ***p<0.001).

A l'aide de test d'invasion cellulaire, nous avons montré, comme pour les CSG qu'une irradiation à la dose de 0,5 Gy provoquait *in vitro* une très forte invasion cellulaire des CSN embryonnaires par rapport aux CSN non irradiées (Figure 1C, ***p<0.001).

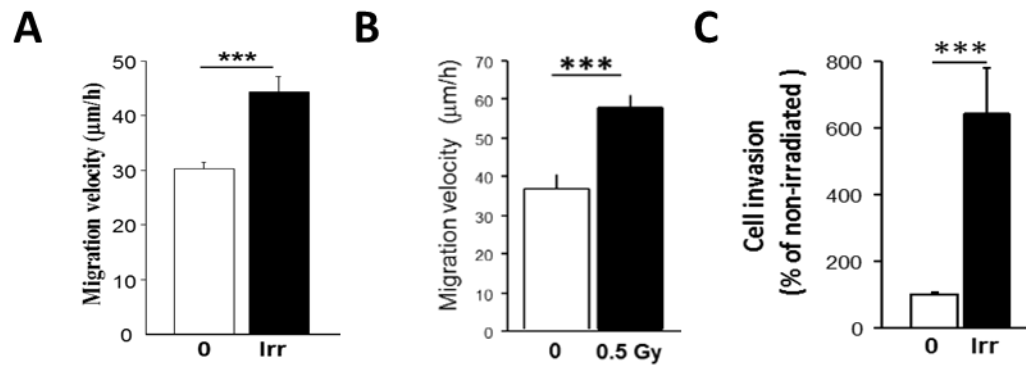


Figure 1: Effets d'une irradiation sublétale (0,5 Gy) sur la migration et l'invasion *in vitro* des CSN humaines et murines. **A et B,** Vitesse moyenne de migration 24 heures après irradiation de CSN embryonnaires humaines (A) et murines (B). Pour chaque condition, un minimum de 120 cellules a été analysé toutes les 10 minutes pendant une période de 4 heures. **(C)** Pourcentage d'invasivité des CSN embryonnaires humaines irradiées par rapport à des CSN non irradiées 29 heures après irradiation (***) $p < 0.001$.

1.2. L'irradiation augmente les capacités d'invasion des CSN greffées dans le cerveau

Afin d'étudier *in vivo* les effets de l'irradiation sur le comportement dynamique des CSN, des expériences de transplantation par stéréotaxie dans le striatum de souris nude adultes de CSN murines irradiées à 0,5 Gy et exprimant constitutivement la GFP ont été menées (Figure 2A). À partir des coupes coronales sériées obtenues deux jours après la greffe, nous avons montré que les CSN irradiées présentent une plus grande dispersion dans le plan coronal (Figure 2B, $*p < 0.05$) ainsi que le long de l'axe antéro-postérieur (Figure 2C, $*p < 0.05$) par rapport aux CSN témoins non irradiées. Ces données indiquent qu'une irradiation sublétale de 0.5 Gy est capable d'augmenter l'invasion des CSN *in vivo*.

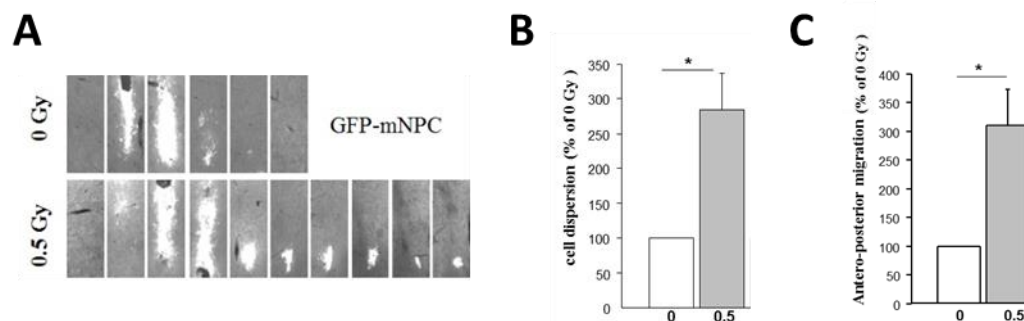


Figure 2: Effets d'une irradiation sublétale (0.5Gy) sur la migration des CSN murines 48 heures après un greffe par stéréotaxie dans le striatum de souris nude. **(A)**, illustration de l'invasion des CSN exprimant la GFP non irradiées (ligne du haut) et irradiées (ligne du bas) autour du point de greffe. **(B et C)**, Quantification de la dispersion cellulaire (B) et de la migration antéro-postérieure (C) des CSN. Données provenant de 4 expériences indépendantes. ($*p < 0.05$).

2. La migration radio-induite *in vitro* des CSN humaines embryonnaires est dépendante de HIF-1 α

Nous nous sommes ensuite intéressés à savoir si la migration radio-induite des CSN était dépendante de HIF-1 α , comme nous l'avions précédemment mis en évidence dans les CSG. Des marquages immunofluorescents dirigés contre HIF-1 α montrent qu'une irradiation de 0,5 Gy provoque une accumulation nucléaire transitoire de HIF-1 α dans les CSN irradiées (Figure 3A et 3B). Cette augmentation, significative dès deux heures après l'irradiation, revient ensuite à son niveau de base 24 heures après l'irradiation. Cette augmentation transitoire et rapide ne repose pas sur une régulation transcriptionnelle de HIF-1 α puisque son niveau d'ARNm estimé par qRT-PCR reste constant au cours du temps après l'irradiation (Figure 3C).

Pour valider définitivement le rôle de HIF-1 α dans la migration radio-induite des CSN, nous avons mesuré la vitesse de migration des CSN en présence de DFO qui provoque artificiellement l'accumulation de HIF-1 α dans les cellules. De cette façon, nous avons mis en évidence que la présence de DFO dans le milieu de CSN non irradiées augmente leur vitesse de migration à un niveau comparable à la vitesse de migration de CSN irradiées (**p<0.01). Alternativement l'inhibition indirecte de HIF-1 α par l'inhibiteur pharmacologique YC-1 (Figure 3C) ou son inhibition spécifique par des siARN diminue significativement la migration radio-induite des CSN irradiées (**p<0.001). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que HIF-1 α est nécessaire à la migration radio-induite des CSN humaines (Figure 3C et 3D), comme précédemment démontré dans les CSG.

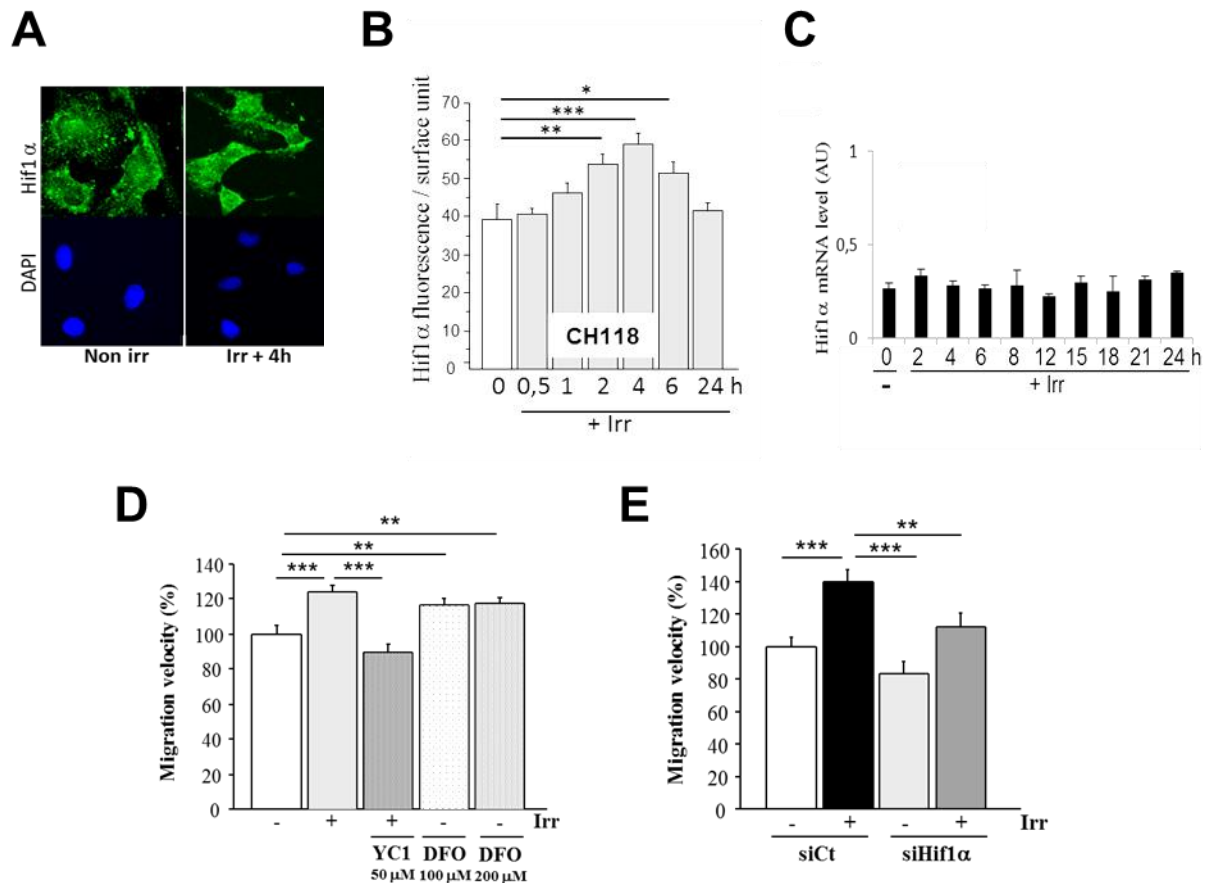


Figure 3: La migration radioinduite des CSN embryonnaires est dépendante de HIF-1 α . **A**, Accumulation nucléaire transitoire de HIF-1 α 4 heures après une irradiation de 0,5 Gy dans les CSN mis en évidence par un marquage immunofluorescent. **B**, Quantification de l'intensité de fluorescence de HIF-1 α au cours du temps dans des CSN irradiées à 0,5 Gy. Un minimum de 50 cellules ont été analysées pour chaque temps. **C**, Quantification par RT-qPCR des ARNm codant pour HIF-1 α dans les CSN à différents temps après irradiation (0,5 Gy). **D**, Effets des traitements YCI ou DFO sur la vitesse de migration des CSN respectivement non irradiées et irradiées. La vitesse de migration est exprimée en pourcentage d'augmentation par rapport à la vitesse des CSN non irradiées. Pour chaque condition 120 cellules ont été suivies toutes les 10 minutes sur une période de 4 heures. **E**, L'inhibition de HIF-1 α empêche la migration radio-induite des CSN. Les CSN ont été transfectées avec des siARN spécifique de HIF-1 α ou un siCT puis irradiées 24 heures après. Un jour après l'irradiation, la vitesse de migration a été déterminée et exprimée en pourcentage du témoin non irradié. Les données ont été obtenues à partir d'au moins 50 cellules par condition (*p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001).

3. Utilisation de CSN déficientes pour HIF-1 α pour valider son rôle dans la migration radio-induite des CSN murines embryonnaires

Dans le but de confirmer l'implication de HIF-1 α dans la migration radio-induite des CSN, j'ai utilisé des CSN issues du modèle transgénique que j'ai développé au cours de ma thèse. Pour rappel, cette souris transgénique repose sur un modèle knockout conditionnel inductible *Glast-CreERT2/R26R-YFP/HIF-1 α ^{lox/lox}* qui est obtenu par croisement de souris *Glast-creERT2-YFP* (Mori et coll., 2005 ; Ferent et coll., 2014) avec des souris *HIF-1 α ^{lox/lox}* (Jackson laboratories).

HIF-1 α est spécifiquement inhibé en présence de tamoxifène dans les cellules de la glie radiaire exprimant GLAST (faisant fonction de cellules souches neurales) qui sont principalement localisées chez l'embryon au bord des ventricules au niveau de la zone corticale ainsi que dans les éminences ganglionnaires latérales (EGL) et à la frontière corticostriatale. L'administration du tamoxifène se fait au jours E14,5 de gestation à la dose de 3 mg/ml. L'excision par la Cre de l'exon 2 du gène HIF-1 α est détectée par l'expression de la protéine YFP.

3.1. La migration radio-induite *in vitro* des CSN murines embryonnaires est dépendante de HIF-1 α

Deux jours après le traitement au tamoxifène (E16,5), les cellules corticales sont prélevées puis triées par cytométrie en flux sur l'expression de la YFP (cellules ayant recombinées déficientes pour HIF-1 α) et de GLAST (Glast⁺YFP⁺) avant leur mise en culture dans des conditions leur permettant de conserver leur caractère souche (facteurs de croissance EGF et FGF2). Comme les CSG, ces cellules sont capables d'adhérer sur un substrat laminine nous permettant ainsi d'évaluer leur capacité de migration par vidéomicroscopie. Vingt-quatre heures après avoir été mises en adhérence sur la laminine, les CSN sont irradiées à la dose de 0,5 Gy et leur vitesse de migration est mesurée toutes les 10 minutes sur une période de 4 heures, 24 heures post-irradiation.

Comme le montre la Figure 4, l'irradiation à la dose de 0,5 Gy augmente significativement la vitesse de migration des cellules témoins YFP positives (***) $p < 0.001$) en comparaison des cellules témoins YFP positives non irradiées. Au contraire, nous n'avons pas observé de changements des vitesses de migration dans les cellules irradiées et déficientes pour HIF-1 α . Ces résultats démontrent donc de manière définitive que l'absence de HIF-1 α au niveau des CSN embryonnaires murines prévient la migration radio-induite *in vitro*.

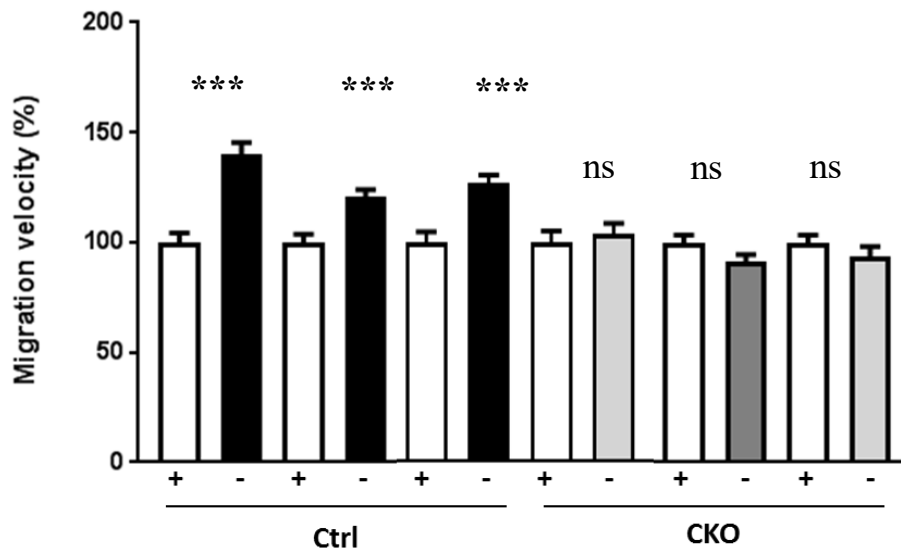


Figure 4 : La migration radio-induite des CSN murines embryonnaires est dépendante de HIF-1 α . Pourcentage de la vitesse de migration des CSN irradiées (0.5 Gy, 24 post-irradiation) provenant des souris contrôles et déficientes pour HIF-1 α par rapport aux CSN non irradiées. Pour chaque condition, un minimum de 100 cellules a été analysé toutes les 10 minutes pendant une période de 4 heures (***p<0.001).

3.2. La migration radio-induite des CSN murines embryonnaires observée *in vivo* est dépendante de HIF-1 α

Suite aux résultats obtenus *in vitro* à partir de culture de CSN GLAST⁺YFP⁺ déficientes pour HIF-1 α obtenues à partir de cerveaux embryonnaires de souris CKO *Glast-CreERT2/R26R-YFP/HIF-1 α ^{Δ/Δ}*, nous avons recherché si une irradiation à la dose de 0,5 Gy était capable de provoquer une augmentation de la migration des cellules GLAST⁺ dans les couches corticales embryonnaires. Pour ce faire, après avoir activé la délétion de HIF-1 α dans les CSN exprimant GLAST chez des embryons de E14,5 et irradié les femelles gestantes à E15,5, les cerveaux embryonnaires ont été récupérés 24 heures après l'irradiation (soit à E16,5) puis fixés avec du PFA à 4%. Après avoir effectué des coupes coronales à partir de cerveaux préalablement mis en paraffine (Tissue-tek VIP processor, Leica), j'ai effectué des coupes coronales de cerveau à l'aide d'un microtome (RM 2125 RT, Leica) pour immunomarquer les cellules exprimant l'YFP. L'analyse du positionnement des cellules exprimant l'YFP par rapport au bord du ventricule dans la zone ventriculaire, la zone sous-ventriculaire et la zone intermédiaire m'ont permis de montrer que 24 heures après une irradiation à la dose de 0,5 Gy, le pourcentage de cellules YFP⁺ chez les embryons

témoins (protéine HIF-1 α fonctionnelle) ayant migrés dans la zone intermédiaire est significativement plus important chez les embryons irradiés en comparaison aux embryons non irradiés (Figure 5A). Ces résultats suggèrent donc qu'une irradiation sublétales de 0,5 Gy induit une migration des CSN dans la zone intermédiaire dans les 24 heures suivant l'irradiation. De manière intéressante, cette migration radio-induite n'est pas observée chez les animaux déficients pour HIF-1 α . En effet, le pourcentage de cellules YFP⁺ dans la zone intermédiaire chez les animaux déficients irradiés est comparable à celui des cellules YFP⁺ retrouvé chez les animaux témoins non irradiés et significativement diminué par rapport à celui retrouvé chez les souris témoins irradiées (Figure 5B, *p<0.05).

Ces résultats préliminaires qui devront être confirmés suggèrent que HIF-1 α pourrait jouer un rôle dans les mécanismes nécessaires à la migration radio-induite des CSN murines embryonnaires *in vivo*.

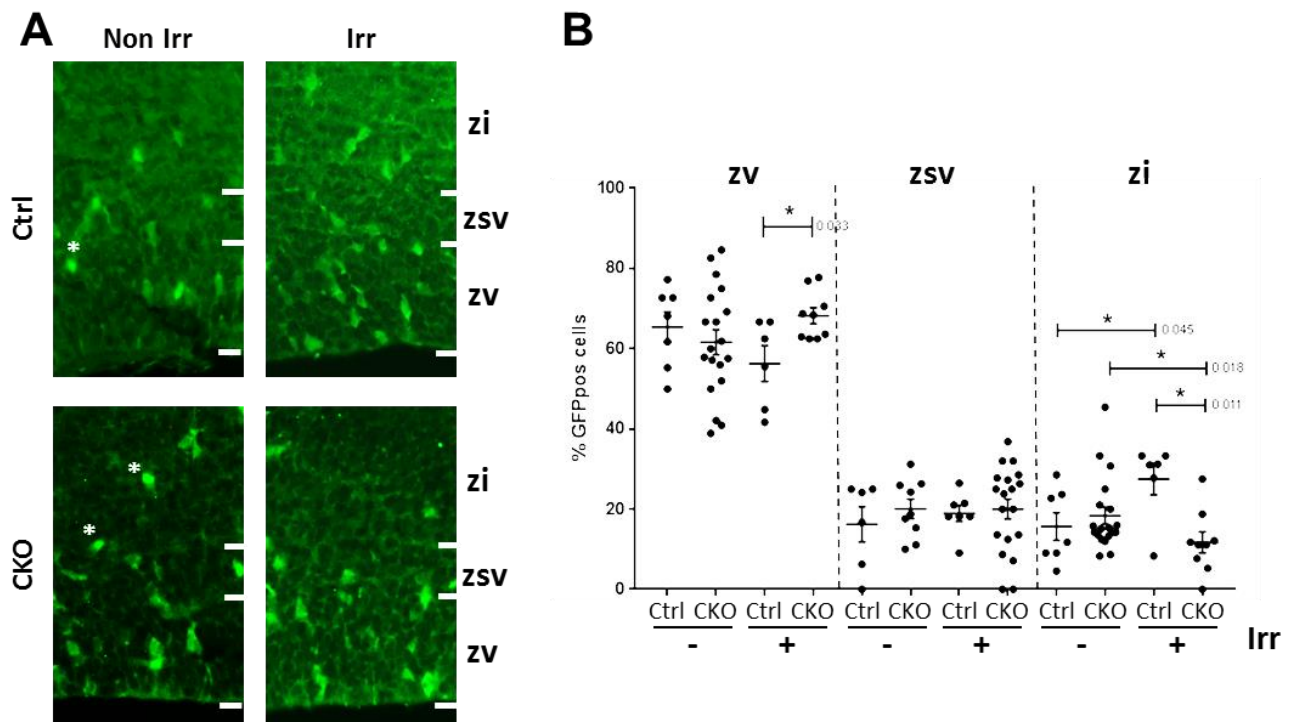


Figure 5: Une irradiation sublétales à la dose de 0,5 Gy induit une migration des cellules de la zone ventriculaire et sous-ventriculaire vers la zone intermédiaire qui est dépendante de HIF-1 α . **A**, Localisation des cellules exprimant la YFP sur des coupes coronales de cerveaux embryonnaires de souris contrôle (GLAST-CRE YFP) et CKO (GLAST-Cre HIF-1 α ΔΔ) en condition normale (Irr) ou 24 heures après irradiation (Irr). **B**, Pourcentage des cellules YFP positives mesurées dans la zone ventriculaire (ZV), dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) et dans la zone intermédiaire (ZI) (*p<0.05).

IV. Discussion

Nous avons mis en évidence qu'une irradiation sublétales de 0.5 Gy est capable de stimuler la migration des cellules souches de gliomes humaines (TG1N, TG10 et TG16). Cette migration radio-induite des CSG apparaît dès 12 heures après l'irradiation et persiste jusqu'à 52 heures post-irradiation. Nous avons également montré qu'une irradiation sublétales accentue le pouvoir invasif des CSG aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* au cours d'expériences de transplantations de CSG irradiées dans le striatum de souris nude. Nous nous sommes ensuite intéressés à rechercher quels pouvaient être les acteurs moléculaires responsables de cette migration/invasion radio-induite des CSG. La mise en œuvre de différents protocoles expérimentaux nous ont permis de démontrer que la migration radio-induite des CSG est associée à une accumulation nucléaire du facteur de transcription HIF-1 α qui intervient en régulant la transcription d'un gène codant pour la protéine JMY. Au final, c'est grâce à son activité de polymérisation des filaments d'actine que JMY favorise la migration/invasion cellulaire des CSG irradiées. La stimulation de la migration par une irradiation sublétales est spécifique du caractère souche des CSG puisqu'aucune migration radio-induite n'a été observée dans les CSG humaines différenciées et irradiées. Par ailleurs, l'irradiation à la dose de 0.5 Gy sur ces cellules différenciées ne provoque pas non plus d'augmentation des niveaux protéiques de HIF-1 α et de JMY. De manière similaire aux CSG, nous avons montré qu'une migration radio-induite dépendante de HIF-1 α est retrouvée dans les cellules souches neurales normales (CSN) murines et humaines, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

1. Rôle de la voie moléculaire HIF-1 α /JMY dans la migration en hypoxie ou après irradiation des CSG

1.1. Implication de HIF-1 α dans la migration/invasion tumorale en hypoxie

L'expression de HIF-1 α induite par l'hypoxie est un facteur important dans l'induction des métastases cancéreuses (Zhong et coll., 1999, Rankin et Giaccia 2016). Dans le glioblastome, HIF-1 α est exprimé autour des zones nécrotiques (Kaur et coll., 2005, Zagzag et coll., 2000) et induit la progression tumorale (Yang et coll., 2012). La migration/invasion tumorale est induite en hypoxie

d'une manière HIF-1 α dépendante *via* l'induction de la TEM où les cellules épithéliales perdent leur polarité et acquièrent un phénotype mésenchymateux qui est aussi responsable de la maintenance du caractère souche. Son inhibition inhibe cet effet migratoire invasif (Zhou et coll., 2013, Joseph et coll., 2015). Le rôle crucial de HIF-1 α dans la métastase et dans la progression tumorale qui conduit aux échecs thérapeutiques implique la nécessité de mieux étudier son rôle et cela nous aidera à limiter la résistance aux traitements du glioblastome limitant ainsi les récurrences de la maladie à long terme. Pour cela, il est largement intéressant de déterminer l'implication des gènes régulés par HIF-1 α qui seront aussi impliqués dans la migration/invasion radio-induite.

1.2. HIF-1 α joue un rôle primordial dans la mise en place des mécanismes impliqués dans la migration/invasion radio-induite des CSG

Comme décrit en condition hypoxique, l'irradiation facilite la migration/invasion tumorale notamment par l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse TEM (Jung et coll., 2007, Lopez-Novoa et Nieto, 2009). Dans les cellules de gliomes, les mécanismes responsables de ce processus sont multiples. Différents travaux de recherche mettent principalement en évidence l'implication des métalloprotéases (MMP2 et MMP9) (Badiga et coll., 2011, Goetze et coll., 2007, Canazza et coll., 2011, Desmarais et coll., 2015, Park et coll., 2012, Dong et coll., 2015, Gogineni et coll., 2011, Hwang et coll., 2006, Park et coll., 2006, Rieken et coll., 2011, Rieken et coll., 2011, Wild-Bode et coll., 2001, Mahabir et coll., 2014) ainsi que des intégrines (Wild-Bode et coll., 2001, Reiken et coll., 2011, Gogineni et coll., 2011, Canazza et coll., 2011, Goetze et coll., 2007). De manière étonnante, une seule étude a étudié l'importance de HIF-1 α dans la migration radio-induite à l'aide de deux lignées cellulaires de gliomes (Kim et coll., 2014). Ces auteurs ont montré que l'accumulation de HIF-1 α *via* la déstabilisation de pVHL et PHD2 (qui dégradent HIF-1 α) provoquée par une irradiation fractionnée (3 x 2 Gy) ou unique (6 Gy) était associée à une augmentation de la migration des cellules de gliomes U87 et U373. Cette migration dépendante de HIF-1 α est corrélée à l'augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux tels que la N-Cadherine, la Vimentine, la fibronectine et de son régulateur Snail. Outre cette étude et malgré le peu de données directes concernant le rôle de HIF-1 α dans la migration radio-induite des cellules de gliomes, des observations ou démonstrations indirectes sur d'autres types cellulaires suggèrent cependant que HIF-1 α pourrait représenter un acteur majeur de la migration/invasion radio-induite du glioblastome. Ainsi, il est bien établi que l'irradiation augmente l'activité de HIF-1 α (Dewhirst et coll., 2008 ; Gottschald et coll., 2010 ; Kedersha et coll.,

1999 ; Moeller et Dewhirst, 2004). Il est également connu que l'augmentation de HIF-1 α radio-induite est impliquée dans la radiorésistance de plusieurs types de cellules cancéreuses (Huang et coll., 2011 ; Kessler et coll., 2010 ; Staab et coll., 2011 ; Ströfer et coll., 2011 ; Vordermark et coll., 2004 ; Zhang et coll., 2004) ainsi que dans la migration/invasion radio-induite des lignées cancéreuses comme le cancer des poumons (Kuo et coll., 2015). L'ensemble de ces données nous encouragent donc à continuer à étudier le rôle de HIF-1 α dans la migration/invasion radio-induite ainsi que d'explorer les gènes HIF-1 α dépendants responsables de la motilité cellulaire pouvant être impliqués dans la migration/invasion radio-induite des CSG.

La migration/invasion radio-induite des cellules souches de gliomes n'avait jusqu'alors pas encore été recherché et/ou mise en évidence. Nos données montrent qu'une irradiation de 0,5 Gy est capable de provoquer une augmentation transitoire de la migration des CSG dépendante de l'accumulation nucléaire de HIF-1 α . L'utilisation d'un stabilisateur de HIF-1 α , le DFO, est aussi capable de stimuler une augmentation de migration des CSG non irradiées comparable à celle observée dans des CSG irradiées. Au contraire, l'emploi d'un inhibiteur indirect de HIF-1 α (YC1) ou direct comme des siARN anti-HIF-1 α confirme que la migration radio-induite dans les CSG est dépendante de HIF-1 α . Nos résultats sont en accord avec les données de Zhou et coll. qui ont montré que l'inhibition de HIF-1 α par l'inhibition des activateurs des RhoGTPases provoque une perte de l'invasivité de lignées de glioblastome (U251 et U87) normalement induite en hypoxie (Zhou et coll., 2013). Il sera intéressant de montrer si les CSG réagissent de manière similaire aux lignées de GBM en condition d'hypoxie en ce qui concerne leur vitesse de migration et leur invasion. En hypoxie, l'accumulation de HIF-1 α ne sera pas transitoire comme celle obtenue après une irradiation ce qui peut nous laisser penser que des mécanismes de régulations différents pourraient être mis en jeu. Il sera également nécessaire d'étudier l'effet de l'irradiation sur des CSG cultivées en hypoxie pour établir quelle pourraient être les conséquences au niveau de la migration des cellules d'un double stimuli irradiation/hypoxie. L'ensemble de ces expériences pourrait révéler de nouvelles régulations qui pourraient à plus long terme représenter des cibles potentielles permettant de limiter la migration des CSG.

1.3. Implication de JMY dans la migration radio-induite des CSG

Parmi les gènes cibles de HIF-1 α qui régulent la motilité cellulaire, nous nous sommes particulièrement intéressés à la protéine JMY qui a été initialement décrite comme un co-facteur de transcription en interagissant avec p300/CBP pour induire la réponse de dommage à l'ADN d'une manière p53 dépendante (Coutts et coll., 2007 ; Shikama et coll., 1999). JMY a été montré comme s'accumulant dans le noyau après l'exposition à différents stress (rayons ultraviolets, étoposide, actinomycine) pour induire l'apoptose d'une manière p53 dépendante. Des données plus récentes montrent également que sa régulation au niveau transcriptionnelle *via* HIF-1 α en condition hypoxique (Coutts et coll., 2011) est associée à une augmentation de la motilité et l'invasion cellulaire *via* sa capacité de nucléation de l'actine (Coutts et coll., 2009 ; Zuchero et coll., 2009). Ces dernières données nous ont donc amené à rechercher si JMY ne pouvait pas être un acteur important dans la migration radio-induite des CSG. Nous avons pu établir que vingt-quatre heures après une irradiation de 0.5 Gy, JMY était surexprimé spécifiquement dans le cytoplasme des CSG sans la présence d'une augmentation nucléaire. L'augmentation du niveau transcriptionnel de JMY significative dès 8 heures post-irradiation est dépendante de l'accumulation nucléaire de HIF-1 α et est progressive et transitoire. Son rôle est confirmé par des expériences s'appuyant sur le traitement des CSG par le DFO, le YC1 et les siARN dirigés contre JMY. Enfin, nous avons montré que l'augmentation de la migration après irradiation est provoquée par une augmentation de la capacité de JMY à nucléer l'actine comme décrit précédemment en condition hypoxique (Coutts et coll., 2009 ; Zuchero et coll., 2009).

L'absence d'accumulation nucléaire de JMY faisant suite à l'irradiation suggère également que JMY n'agit pas comme un cofacteur de transcription *via* p53. Cette observation est renforcée par le fait que la migration radio-induite est retrouvée de manière comparable aussi bien dans des CSG avec un p53 sauvage que déficient. La mise en place d'irradiations à plus fortes doses nous permettrait d'étudier l'impact nucléaire de JMY sur la migration cellulaire des CSG. Il serait également intéressant d'investiguer les conséquences de la surexpression de JMY et de HIF-1 α sur la migration des cellules différenciées afin de voir si la migration cellulaire est augmentée comme celle rapportée après une irradiation sublétales.

Il sera intéressant de continuer à explorer le rôle de JMY dans la migration radio-induite des CSG. En effet, JMY pourrait représenter une cible thérapeutique d'importance pour éviter la migration radio-induite des CSG pouvant avoir lieu au cours d'un protocole classique de radiothérapie. Il sera

nécessaire de valider le rôle de JMY dans l'invasion radio-induite aussi bien dans des tests *in vitro* (invasion) qu'*in vivo* (transplantation de CSG déficientes pour JMY et préalablement irradiées). A moyen terme, il serait nécessaire de rechercher des inhibiteurs spécifiques de JMY en mettant par exemple en place un screening de molécules à partir de chimiothèques. Avec cet outil, nous pourrions identifier des molécules susceptibles d'inhiber la migration radio-induite des CSG irradiées. Une fois sélectionnées, ces molécules devront être validées dans notre modèle préclinique de greffes intracérébrales de CSG dans le cerveau de souris (Jeitany et coll., 2015 ; Pineda et coll., 2017). A l'aide d'un nouvel irradiateur en cours d'installation dans notre unité (SARPP), il sera intéressant d'irradier localement les cellules greffées avec un protocole mimant un traitement de radiothérapie classique et d'étudier *in vivo* par bioluminescence l'effet de ces molécules sur l'invasion cellulaire au cours du temps.

1.4 L'induction des métallo-protéases par HIF-1 α pourrait-elle jouer un rôle dans la migration radio-induite des CSG ?

Les métallo-protéases (MMPs) ont été démontrées comme responsables de l'augmentation de l'invasion et de l'angiogenèse des gliomes (Nakada et coll., 2003, Rao 2003). La surexpression de HIF-1 α induite par l'hypoxie dans différentes lignées de gliomes est capable d'induire une invasion cellulaire importante qui est corrélée à une augmentation transcriptionnelle des métalloprotéases MMP2 et à la diminution des inhibiteurs des métallo-protéases TIMP2 (Fujiwara et coll., 2007 ; Zhang et coll., 2013). De manière similaire à l'hypoxie, l'augmentation de la migration cellulaire après irradiation dans de nombreuses lignées de gliome est associée à une augmentation d'activité des MMPs, et plus particulièrement de la MMP2 (Park et coll., 2006, Wild-Bode et coll., 2001, Badiga et coll., 2011, Dong et coll., 2015, Desmerais et coll., 2015, Park et coll., 2012, Furmanova-Hollenstein et coll., 2013) et de la MMP9 (Wild-Bode et coll., 2001, Dong et coll., 2015, Cheng et coll., 2006, Furmanova-Hollenstein et coll., 2013). Parallèlement, l'irradiation dans ces mêmes lignées de gliome, provoque une diminution des inhibiteurs de protéases comme TIMP2 (Wild-Bode et coll., 2001, Furmanova-Hollenstein et coll., 2013). L'ensemble de ces données majoritairement obtenues *in vitro* met en évidence que les MMPs joueraient un rôle important dans la migration radio-induite des lignées de glioblastomes. Il nous semble donc nécessaire d'étudier plus en détail dans les CSG irradiées à des doses sublétales, si les MMPs pourraient jouer un rôle dans la mise en place de la migration radio-induite rapportée chez les CSG.

1.5 L'augmentation de JMY *via* HIF-1 α pourrait-elle exercée une influence sur d'autres protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire des CSG ?

Les cadhérines, comme la E- et la N-cadherine sont des glycoprotéines qui permettent les interactions intercellulaires (D'Souza-Schorey, 2005) et qui par conséquent sont intimement liées à la migration/invasion cellulaire et à la progression tumorale. En effet, la perte de l'expression de l'E-cadhérine est corrélée avec l'invasion et la métastase tumorale (Jeanes et coll., 2008) alors que son expression inhibe la motilité des cellules tumorales (Syed et coll., 2008, Nam et coll., 2004). De manière intéressante, Coutts et coll. ont mis en évidence que JMY était capable de réguler l'expression de la E- et de la N-cadhérine (Coutts et coll, 2009). Ainsi, l'inhibition de JMY par des siARN dans des cellules tumorales mammaires MCF7 et dans les lignées d'ostéosarcomes U2OS et SAOS provoque respectivement une augmentation significative de la E-cadhérine et de la N-cadhérine qui sont toute les deux associées à une diminution de motilité cellulaire. Inversement, la surexpression de JMY provoque une stimulation de la migration cellulaire (Coutts et coll, 2009). Au vue de ces données, et parce que l'irradiation provoque une diminution d'expression des cadhérines (Jung et coll., 2007; Lopez-Novoa et Nieto, 2009), il nous apparaît donc intéressant de déterminer si une irradiation sublétales est capable ou non d'induire des changements d'expression de ces cadhérines dans les CSG en relation avec JMY et l'apparition d'une migration radio-induite. Le même type d'analyse pourra également s'effectuer sur des CSG différenciées.

2. HIF-2 α joue-t-il un rôle dans la migration radio-induite des CSG ?

Comme HIF-1 α , HIF-2 α est également exprimé au niveau nucléaire dans les cellules de GBM. A l'instar de HIF-1 α , il nous apparaît normal de s'interroger sur le rôle que HIF-2 α pourrait avoir dans la migration radio-induite des CSG. En effet, l'analyse de la densité des cellules exprimant HIF-1 α et HIF-2 α montre que l'expression de HIF-2 α est plus élevée que HIF-1 α dans les régions tumorales et péri-tumorales du GBM, suggérant que ces deux facteurs pourraient jouer des rôles différents dans la régulation du développement du GBM (D'Alessio et coll., 2016).

Au niveau des CSG, HIF-1 α et HIF-2 α sont aussi présents avec une préférence d'expression de HIF-2 α dans les cellules souches par rapport aux cellules non souches (Binello et Germano, 2011). D'autre part, il faut noter que :

1) HIF-2 α est impliqué dans l'induction de la TEM (Joeseph et coll., 2015) et altère la motilité des cellules de gliomes (Xu et coll., 2015).

2) HIF-2 α est capable de réguler c-myc, le responsable du phénotype indifférencié des cellules souches tumorales de la niche hypoxique (Gordan et coll., 2007a, 2007b).

3) HIF-2 α favorise également le phénotype souche des cellules souches de gliomes par la surexpression des gènes de pluripotence Sox2 et Oct4 (Bar et coll., 2010 ; Li et coll., 2009 ; Pietras et coll., 2010 ; Soeda et coll., 2009, Covello et coll., 2006 ; Moreno-Manzano et coll., 2010; Seidel et coll., 2010). L'activation de Sox2 s'effectue *via* l'induction de HIF-2 α (et pas de HIF-1 α) par le domaine C-terminal intercellulaire de CD44, un récepteur transmembranaire glycoprotéique considéré comme un marqueur des cellules souches dans les tissus normaux et néoplasiques (Zöller, 2011).

4) Le ciblage de HIF-2 α dans les CSG, qui est co-localisé avec les marqueurs des cellules souches, inhibe l'autorenouvellement, la prolifération et la survie *in vitro* et atténue le potentiel d'initiation de tumeur des CSG *in vivo* (Li et coll., 2009).

5) Enfin, la sous-expression de HIF-2 α diminue spécifiquement la survie des CSG alors que la sous-expression de HIF-1 α diminue la survie aussi bien des CSG que des cellules non souches de gliomes (Li et coll., 2009).

Au vue de ces données, et même si l'inhibition de HIF-1 α ou de HIF-2 α diminue de façon identique la tumorigénicité des CSG (Li et coll., 2009), il semble bien établi que HIF-2 α joue un rôle important dans le maintien du caractère souche des CSG. En revanche, à notre connaissance il n'existe pas encore d'études s'intéressant spécifiquement au rôle que pourrait avoir HIF-2 α dans les phénomènes de migration des cellules de GBM. Il nous apparaît ainsi intéressant de déterminer si HIF-2 α est susceptible de jouer un rôle direct ou indirect dans la migration et/ou la migration radio-induite des CSG.

3. Importance du caractère souche et non souche des cellules de GBM dans la migration/invasion radio-induite

Des preuves de plus en plus nombreuses indiquent que l'irradiation pourrait favoriser un comportement métastatique des cellules cancéreuses (Barcellos-Hoff et coll., 2005; Madani et coll., 2008). Les données traitant le mécanisme des métastases cancéreuses induites par l'irradiation sont multiples. Ainsi, de nombreuses études utilisant différents types de lignées

cancéreuses et plus spécifiquement des lignées de gliomes ont mis en évidence que l'irradiation (à des doses d'irradiation variées comprise entre 1 Gy et 20 Gy pour les gliomes) induit une augmentation de la migration/invasion (Tableau 4 et 5 ; Moncharmont et coll., 2014., Falk et coll., 2014., Sundahl et coll., 2018). En revanche, de manière surprenante jusqu'à maintenant aucune étude n'avait mis en évidence une induction de la migration/invasion dans les CSG après un stress radiatif. Les résultats découlant de ces recherches sont d'autant plus importants puisque les cellules souches diffèrent des autres cellules tumorales par leur capacité à maintenir une hiérarchie cellulaire, à s'auto-renouveler, et à avoir une sensibilité diminuée à l'apoptose radio-induite *in vitro* et *in vivo* (Bao et coll., 2006 ; Diehn et coll., 2009 ; Chargari et coll., 2012 ; Jamal et coll., 2012). Elles sont aussi décrites comme étant impliquées dans la radiorésistance des tumeurs (Bao et coll., 2006 ; Pajonk et coll., 2010 ; Qiu et coll., 2011 ; Jamal et coll., 2012). C'est pourquoi nous avons étudié si une irradiation ionisante était capable de stimuler la migration/invasion des cellules souches de gliomes. Outre la démonstration qu'une irradiation sublétales de 0.5 Gy provoque une migration/invasion radio-induite des CSG, nous avons pu établir que la stimulation de la migration/invasion par la dose sublétales de 0.5 Gy est observée uniquement dans les CSG et pas dans les cellules différenciées issues de ces CSG. Nos données sont en accord avec la majorité des études précédemment publiées qui, sur des lignées de gliome non souche, ont pu mettre en évidence une augmentation de la migration/invasion uniquement à des doses supérieures à 1 Gy (Badiga et coll., 2011, De Bacco et coll., 2011, Goetze et coll., 2007, Canazza et coll., 2011, Ghosh et coll., 2014, Desmerais et coll., 2015, Park et coll., 2012, Dong et coll., 2015, Fehlaue et coll., 2007, Hwang et coll., 2006, Park et coll., 2006, Rieken et coll., 2011, Steinle et coll., 2011, Wild-Bolde et coll., 2001, Kim et coll., 2014, Mahabir et coll., 2014, Wick et coll., 2002, Furmanova-Hollenstein et coll., 2013, Zhai et coll., 2006). Ces données associées à nos résultats suggèrent donc que le seuil minimal d'irradiation nécessaire à la stimulation de la migration pourrait être dépendant du caractère souche. En d'autre terme, la migration radio-induite des CSG se déclencherait à un seuil d'irradiation plus faible que pour des cellules de gliome non souches. Pour confirmer cette hypothèse, il serait ainsi intéressant d'irradier les cellules différenciées issues des CSG avec des doses croissantes d'irradiation (supérieures à 0,5 Gy) afin de confirmer si des doses d'irradiation supérieures à 1 Gy sont capables d'induire une augmentation de la migration dans ces cellules.

3.1. La différenciation *in vivo* des CSG peut-elle prévenir la migration/invasion radio-induite des CSG ?

Le traitement conventionnel des GBM ne donne pas de réponses efficaces et satisfaisantes au vue de la durée de survie des patients qui reste inférieure à deux ans (Wen et Kesari, 2008 ; Stupp et coll., 2009). La présence des CSG au sein des GBM serait en grande partie responsable de cette résistance aux traitements. La mise en évidence d'une migration radio-induite des CSG pourrait contribuer de manière significative à cette radorésistance des GBM. Du fait de la plasticité du programme de différenciation des cellules tumorales (Leszczyniecka et coll., 2001 ; Staudt et coll., 2007), il serait intéressant d'envisager d'induire la différenciation des CSG permettant ainsi d'entraver la capacité d'autorenouvellement des CSG et donc de réduire la production de CSG capables de repeupler la tumeur ayant été irradiées. D'autre part, si nos résultats *in vitro* montrant que des CSG « différenciées » ne sont pas capables de stimuler leur migration après une irradiation sont validés *in vivo*, cette approche de différenciation des CSG empêcherait indirectement l'apparition de la migration radio-induite. Cette approche pourrait être utilisée en concomitance avec la radiothérapie et être moins toxique que l'utilisation des agents chimiothérapeutiques anticancéreux conventionnels (Leszczyniecka et coll., 2001 ; Staudt et coll., 2007). Bien qu'un certain nombre d'agents aient déjà été testés dans cet objectif au cours des dernières années, l'agent de différenciation le plus étudié et cliniquement testé est l'acide rétinoïque (AR ou Vitamine A). L'AR induit une différenciation cellulaire et cible les CSG (Gudas et Wagner, 2011 ; Karsy et coll., 2010 ; Sell 2004) en régulant négativement leurs marqueurs souches (CD133, nestine, sox2), et en diminuant *in vitro* la formation de colonies issues de ces CSG (Campos et coll., 2010). De manière intéressante, l'AR est également capable d'inhiber l'expression des MMP2 et MMP9, inhibant ainsi la migration et l'invasion cellulaire (Papi et coll., 2007). De ce fait, il sera intéressant de tester l'effet de l'AR sur la migration/invasion radio-induite des CSG tout en analysant son effet sur le niveau d'expression de HIF-1 α , de JMY et des voies moléculaires précédemment décrites dans les lignées de glioblastomes (MMPs, etc...).

Une autre stratégie pour induire la différenciation des CSG serait de favoriser l'expression des cadhérines permettant d'éradiquer les cellules souches cancéreuses (Beug et coll., 2009). Cette stratégie est d'autant intéressante que comme précédemment mentionnée, l'inhibition de JMY a été démontré comme capable d'induire une augmentation de l'expression de la E- et N-cadhérine qui par conséquence inhibe la migration des lignées cancéreuses (Coutts et coll, 2009).

3.2. La dédifférenciation des cellules cancéreuses de GBM favoriserait-elle la migration radio-induite ?

Différentes études ont rapporté dans plusieurs types de cancers (cancer du sein, de la prostate, du foie, mélanomes) que l'irradiation thérapeutique pouvait être à l'origine de l'induction du caractère souche des cellules cancéreuses (Ghisolfi et coll., 2012, Cho et coll., 2012 ; Lagadec et coll., 2012, Lee et coll., 2015). Au niveau du cancer de prostate par exemple, l'irradiation induit une augmentation de la population souche cancéreuse exprimant le marqueur souche CD44⁺ (Cho et coll., 2012). Similairement, l'exposition de cellules cancéreuses hépatiques à un rayonnement gamma ionisant favorise dans des conditions de culture « souche », l'apparition d'hepatosphères, suggérant que certains régulateurs des cellules souches sont ré-exprimés dans les cellules cancéreuses faisant suite à l'irradiation (Piao et coll., 2012). Au niveau moléculaire, l'analyse de l'expression des gènes radio-induits montre une régulation positive des ARNm codant pour des marqueurs associés au caractère souche comme Sox2 et Oct3/4 (Ghisolfi et coll., 2012, Lagadec et coll., 2012). D'autres études ont mis en évidence que des facteurs de transcription comme HIF-1 α (Helczynska et coll., 2003 ; Jogi et coll., 2003) et/ou des voies de signalisation impliquant Snail, STAT3, Notch, PI3K/Akt ou bien encore des MAPK sont activées dans ces processus de dédifférenciation cellulaire (Phillips et coll., 2006, Wu et coll., 2016). Concernant les GBM, il a été montré par exemple que le traitement de lignées de GBM avec un alkylant (Carmustine) induisait l'apparition d'une population de cellules souches cancéreuses exprimant des marqueurs souches (CD133, CD117, CD90, ...) possédant des capacités de multipotence et capable de générer des tumeurs après transplantation dans des cerveaux de souris SCID (Kang et Kang 2007). Plusieurs autres études avaient avancé l'hypothèse que les cellules de GBM possédaient la capacité de se dédifférencier en cellules souches cancéreuses lorsqu'elles étaient soumises à des stimuli appropriés (Charles et Holland, 2009). Cette hypothèse est étayée par des études montrant qu'en condition hypoxique, ou en présence de facteurs de croissance ou de témozolomide, un tel phénomène de dédifférenciation est possible dans les cellules de GBM (Heddleston et coll., 2009 ; Auffinger et coll., 2014 ; Li et coll., 2011). Une irradiation est également capable d'induire l'expression de marqueurs souches (comme Sox2, nestin et CD133) dans des lignées de GBM (Kim et coll., 2011). Enfin récemment, Dahan et coll. ont confirmé ces données en concluant qu'une radiothérapie est capable d'induire un shift des cellules de GBM vers un phénotype souche qui pourrait ainsi participer à l'expansion des CSG et finalement favoriser une récurrence rapide de ces cancers du cerveau caractérisés par une agressivité et une invasivité importantes (Dahan et coll., 2014). Ainsi, même si

d'autres études restent nécessaires pour préciser les mécanismes impliqués dans ce phénomène de différenciation de cellules de GBM, ces données suggèrent que l'irradiation des GBM favoriserait une dédifférenciation de certaines cellules en cellules souches leur permettant au final de « redevenir » sensibles aux faibles doses d'irradiation et d'acquérir des capacités de migration/invasion accrues après irradiation. Du fait que le protocole de radiothérapie classiquement utilisé repose sur des expositions fractionnées sur plusieurs jours, ce processus de dédifférenciation puis de migration radio-induite n'est pas à exclure. La mise en place d'un protocole reposant sur des irradiations fractionnées et localisées chez des souris développant un GBM après une greffe de CSG au niveau du cerveau, nous serait d'une grande utilité pour mieux caractériser les effets des irradiations sur les GBM en générale et en particulier sur ces phénomènes de différenciation des CSG et de la dédifférenciation des cellules de GBM sans oublier bien entendu les processus de migration radio-induite.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse, je me suis intéressée à étudier le rôle de HIF-1 α dans la neurogenèse corticale embryonnaire en développant un modèle murin transgénique conditionnel Glast-YFP-CreERT2 ; HIF-1 α ^{flox/flox} dans lequel HIF-1 α est spécifiquement inhibé dans les cellules de la glie radiaire GLAST⁺, cellules faisant office de cellules souches neurales chez l'embryon. Parallèlement à ce travail, j'ai participé à la caractérisation d'une nouvelle voie moléculaire dépendante de HIF-1 α impliquée dans la migration radio-induite des cellules souches de glioblastomes.

HIF-1 α , connu comme le principal facteur de transcription induit en condition hypoxique, a par ailleurs été montré comme étant essentiel pour le développement précoce des mammifères (Iyer et coll., 1998, Kotch et coll., 1999). Son rôle au niveau de la neurogenèse corticale embryonnaire n'avait jusqu'alors été que peu étudié notamment au niveau des sous-populations cellulaires du cortex en développement. Une fois j'ai mis en évidence une diminution significative de HIF-1 α dans les cellules souches neurales GLAST⁺ préalablement triées par cytométrie de flux, j'ai pu montrer que la délétion de HIF-1 α provoquait à deux temps de développement différent (E14,5 et E16,5) des effets similaires se résumant à une altération de l'angiogenèse, de la prolifération cellulaire et du nombre de figures mitotiques. J'ai également montré que HIF-1 α est nécessaire au développement harmonieux du cortex cérébral puisqu'en son absence, le nombre de CSN exprimant Sox2 ou Pax6 diminue rapidement de manière significative au niveau de la ZV et ZSV alors que le nombre de progéniteurs intermédiaires Tbr2⁺ et le nombre de neurones post-mitotiques Tbr1⁺ augmente au niveau de la ZSV et de la ZI respectivement. Ces altérations sont associées à une diminution globale de l'épaisseur du cortex sans que des phénomènes d'apoptose cellulaire soient mis en évidence.

Dans le but de valider et /ou de préciser ces résultats, il serait intéressant de compléter nos résultats par des analyses *ex vivo* réalisées à l'aide d'immunomarquages sur des cellules YFP⁺ par cytométrie en flux, en utilisant par des anticorps dirigés entre autres, contre Pax6/Sox2/Tbr2/Tbr1 afin d'analyser la proportion des différentes sous population cellulaire provenant des animaux HIF-1 α CKO par rapport aux animaux témoins. Ces données nous permettront de confirmer nos données d'immunofluorescence effectuées sur les coupes coronales de cerveaux. La mise en place de cultures *in vitro* de CSN YFP⁺ issues des souris témoins et HIF-1 α CKO nous permettra d'étudier l'impact de HIF-1 α sur de nombreux processus biologiques mesurables *in vitro* comme la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire, la différenciation cellulaire ou encore la migration de ces cellules. Enfin, l'utilisation de ce modèle devrait également nous permettre d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires dépendants de HIF-1 α nécessaire à la neurogenèse embryonnaire. La mise en place d'une étude

transcriptomique devrait nous permettre d'identifier plus précisément de nouveaux gènes dépendants de HIF-1 α impliqués dans la mitose, la prolifération et la différenciation des CSN. Ces gènes, une fois validés par des RT-PCR, seront étudiés *in vitro* sur des cultures de CSN par des expériences de sous-expression ou de surexpression. Leur localisation pourra être également recherchée sur des coupes coronales de cerveau.

Ce modèle de souris conditionnel inductible Glast-YFP-CreERT2 ; HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ peut également être utilisé pour étudier l'impact de HIF-1 α au niveau des CSN dans le cerveau adulte. Des études préliminaires effectuées au laboratoire ont ainsi permis d'inhiber HIF-1 α au niveau des CSN dans le but d'étudier l'impact de HIF-1 α sur le neurogenèse adulte en analysant le devenir des différentes sous-populations corticales par immunomarquage et/ou cytométrie en flux.

La deuxième partie du travail a permis de mettre en évidence l'implication d'une nouvelle voie moléculaire dépendante de HIF-1 α dans les mécanismes associés à la migration/invasion radio-induite des CSG. Cette voie qui fait intervenir la régulation de la protéine JMY par HIF-1 α a été montrée comme spécifique du caractère souche des CSG puisqu'absente des CSG différenciées et irradiées à la dose de 0,5 Gy (dose nécessaire et suffisante pour activer la migration radio-induite des CSG). La découverte de cette voie de régulation est d'autant plus intéressante et prometteuse au niveau clinique, la majorité des patients avec un GBM présente un pronostic de survie faible s'expliquant par la présence quasi-systématique de récurrences pouvant être liées à l'échappement des CSG à la chimiothérapie et à la radiothérapie. L'identification, et à plus long terme l'inhibition de ces mécanismes moléculaires stimulant la migration radio-induite des CSG au cours de la radiothérapie pourrait donc permettre d'assurer une amélioration de l'efficacité des traitements des patients atteints de glioblastomes limitant ainsi les complications et les récurrences associées aux Glioblastomes. De ce fait, le ciblage thérapeutique de la voie HIF-1 α /JMY pourrait peut-être permettre d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie en inhibant la migration radio-induite des CSG. Il a d'ores et déjà été montré *in vivo* que le blocage de HIF-1 α dans les tumeurs hypoxiques améliore les effets de la radiothérapie (Moeller et coll., 2005). Cependant au vue des nombreuses voies de signalisation dépendantes de HIF-1 α , il reste facile d'imaginer que son inhibition pourrait entraîner de nombreux effets secondaires délétères. En effet, même si certaines molécules pharmacologiques font l'objet d'essais précliniques et cliniques dans différentes pathologies cancéreuses dont le Glioblastome, il n'y a encore à l'heure actuelle aucun médicament inhibant directement les HIFs qui a été approuvé pour le traitement de patients cancéreux en raison de leur efficacité thérapeutique limitée. Ainsi, le ciblage de

JMY pourrait représenter une cible plus spécifique pour l'inhibition de la migration radio-induite des CSG. Cependant là encore de nombreuses études devront être effectuées pour valider définitivement le possible intérêt thérapeutique que peut représenter JMY.

Nos résultats concernant la migration radio-induite des CSG ont principalement été obtenus au cours d'expériences *in vitro*. Il est maintenant nécessaire de poursuivre nos recherches en validant ces données dans des modèles *in vivo*. En effet, certaines études ont montré que la radio-sensibilité *in vitro* de plusieurs lignées cellulaires tumorales (Diehn et coll., 2009; Sedelnikova et coll., 2002) ainsi que celle des cultures primaires (Banáth et coll., 2004) ne prédisent pas la réponse à la radiothérapie *in vivo* (McCord et coll., 2009). Ainsi, la mise en place de transplantations de CSG ou de CSG « différenciées » sur ou sous exprimant HIF-1 α ou JMY seront nécessaires. Couplé à ces greffes intracérébrales, il faudra, comme déjà proposé, mettre en place un protocole d'irradiation mimant les protocoles de radiothérapie utilisé pour traiter les GBM chez l'homme.

En conclusion, la mise en place et le développement d'un modèle transgénique knockout conditionnel inductible Glast-YFP-CreERT2; HIF-1 α ^{flox/flox} effectué au cours de ce travail de thèse m'a permis de montrer que HIF-1 α retrouvé au niveau des CSN représente un acteur essentiel dans la neurogenèse embryonnaire. HIF-1 α joue notamment un rôle dans le maintien ou la perte de certaines sous-populations cellulaires corticales nécessaires au développement du cortex cérébral. Concernant la migration radio-induite, HIF-1 α est un élément clé initiateur de l'activation de ce processus chez les CSG par sa fonction de facteur de transcription. Il semble clair qu'outre la voie HIF-1 α /JMY, HIF-1 α régule un ensemble d'autres gènes impliqués dans la migration radio-induite qui restent à confirmer ou à découvrir dans les CSG humaines.

BIBLIOGRAPHIE

- A Dames, S., Martinez-Yamout, M., N De Guzman, R., Dyson, J., Wright, P., 2002. Structural basis for HIF-1 α /CBP recognition in the cellular hypoxic response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 5271–6.
- Aaku-Saraste, E., Oback, B., Hellwig, A., Huttner, W.B., 1997. Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. *Mech. Dev.* 69, 71–81.
- Abdollahi, A., Folkman, J., 2010. Evading tumor evasion: current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. *Drug Resist. Updat.* 13, 16–28.
- Abedin, M.J., Nguyen, A., Jiang, N., Perry, C.E., Shelton, J.M., Watson, D.K., Ferdous, A., 2014. Fli1 acts downstream of Etv2 to govern cell survival and vascular homeostasis via positive autoregulation. *Circ. Res.* 114, 1690–1699.
- Abramihina, T.V., Isaev, D.A., Semechkin, R.A., 2012. Effect of hypoxia on neural induction in colonies of human parthenogenetic stem cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* 154, 130–132.
- Akino, Y., Teshima, T., Kihara, A., Kodera-Suzumoto, Y., Inaoka, M., Higashiyama, S., Furusawa, Y., Matsuura, N., 2009. Carbon-Ion Beam Irradiation Effectively Suppresses Migration and Invasion of Human Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Int. J. Radiat. Oncol. • Biol. • Phys.* 75, 475–481.
- Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41, 683–686.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M., 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 629–634.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M., Tramontin, A.D., 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 287–293.
- An, W.G., Kanekal, M., Simon, M.C., Maltepe, E., Blagosklonny, M.V., Neckers, L.M., 1998. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α . *Nature* 392, 405–408.
- Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., Rubenstein, J.L., 1997. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278, 474–476.
- Arai, Y., Pulvers, J.N., Haffner, C., Schilling, B., Nüsslein, I., Calegari, F., Huttner, W.B., 2011. Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun* 2, 2, 154, 154–154.
- Asami, M., Pilz, G.A., Ninkovic, J., Godinho, L., Schroeder, T., Huttner, W.B., Götz, M., 2011. The role of Pax6 in regulating the orientation and mode of cell division of progenitors in the mouse cerebral cortex. *Dev. Camb. Engl.* 138, 5067–5078.
- Atlas, M., Bond, V.P., 1965. The cell generation cycle of the eleven-day mouse embryo. *J. Cell Biol.* 26, 19–24.
- Attardo, A., Calegari, F., Haubensak, W., Wilsch-Bräuninger, M., Huttner, W.B., 2008. Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. *Live Imaging at the Onset of Cortical Neurogenesis Reveals Differential Appearance of the Neuronal Phenotype in Apical versus Basal Progenitor Progeny.* *PLoS One* 3, 3, e2388–e2388.
- Auffinger, B., Tobias, A.L., Han, Y., Lee, G., Guo, D., Dey, M., Lesniak, M.S., Ahmed, A.U., 2014. Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death Differ.* 21, 1119–1131.

- Azoitei, N., Becher, A., Steinestel, K., Rouhi, A., Diepold, K., Genze, F., Simmet, T., Seufferlein, T., 2016. PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1 α through NF- κ B activation. *Mol. Cancer* 15, 3.
- Baala, L., Briault, S., Etchevers, H.C., Laumonier, F., Natiq, A., Amiel, J., Boddaert, N., Picard, C., Sbiti, A., Asermouh, A., Attié-Bitach, T., Encha-Razavi, F., Munnich, A., Sefiani, A., Lyonnet, S., 2007. Homozygous silencing of T-box transcription factor EOMES leads to microcephaly with polymicrogyria and corpus callosum agenesis. *Nat. Genet.* 39, 454–456.
- Badiga, A.V., Chetty, C., Kesanakurti, D., Are, D., Gujrati, M., Klopfenstein, J.D., Dinh, D.H., Rao, J.S., 2011. MMP-2 siRNA inhibits radiation-enhanced invasiveness in glioma cells., MMP-2 siRNA Inhibits Radiation-Enhanced Invasiveness in Glioma Cells. *PLoS One* 6, 6, e20614–e20614.
- Bae, M.-K., Ahn, M.-Y., Jeong, J.-W., Bae, M.-H., Lee, Y.M., Bae, S.-K., Park, J.-W., Kim, K.-R., Kim, K.-W., 2002. Jab1 interacts directly with HIF-1 α and regulates its stability. *J. Biol. Chem.* 277, 9–12.
- Balhorn, R., Jackson, V., Granner, D., Chalkey, R., 1975. Phosphorylation of the lysine-rich histones throughout the cell cycle. *Biochemistry* 14, 2504–2511.
- Ban, H.S., Uto, Y., Won, M., Nakamura, H., 2016. Hypoxia-inducible factor (HIF) inhibitors: a patent survey (2011-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 26, 309–322.
- Ban ath, J.P., MacPhail, S.H., Olive, P.L., 2004. Radiation Sensitivity, H2AX Phosphorylation, and Kinetics of Repair of DNA Strand Breaks in Irradiated Cervical Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* 64, 7144–7149.
- Bao, B., Azmi, A.S., Ali, S., Ahmad, A., Li, Y., Banerjee, S., Kong, D., Sarkar, F.H., 2012. The biological kinship of hypoxia with CSC and EMT and their relationship with deregulated expression of miRNAs and tumor aggressiveness. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1826, 272–296.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., Rich, J.N., 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760.
- Bar, E.E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W., Eberhart, C.G., 2010. Hypoxia Increases the Expression of Stem-Cell Markers and Promotes Clonogenicity in Glioblastoma Neurospheres. *The American Journal of Pathology* 177, 1491–1502.
- Barak, V., Pe’er, J., Kalickman, I., Frenkel, S., 2011. VEGF as a Biomarker for Metastatic Uveal Melanoma in Humans. *Curr. Eye Res.* 36, 386–390.
- Barcellos-Hoff, M.H., 2013. New Biological Insights on the Link Between Radiation Exposure and Breast Cancer Risk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 18, 3–13.
- Barcellos-Hoff, M.H., Park, C., Wright, E.G., 2005. Radiation and the microenvironment – tumorigenesis and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 5, 867–875.
- Barry, G., Piper, M., Lindwall, C., Moldrich, R., Mason, S., Little, E., Sarkar, A., Tole, S., Gronostajski, R.M., Richards, L.J., 2008. Specific Glial Populations Regulate Hippocampal Morphogenesis. *J. Neurosci.* 28, 12328–12340.
- Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., Yeoh, K.-W., 2014. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front. Mol. Biosci.* 1, 24.
- Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C.G., Khodjakov, A., Raff, J.W., 2006. Flies without centrioles. *Cell* 125, 1375–1386.
- Beasley, N.J.P., Leek, R., Alam, M., Turley, H., Cox, G.J., Gatter, K., Millard, P., Fuggle, S., Harris, A.L., 2002. Hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res.* 62, 2493–2497.

- Beck, C., Piontek, G., Haug, A., Bas, M., Knopf, A., Stark, T., Mißbeck, M., Rudelius, M., Reiter, R., Brandstetter, M., Pickhard, A., 2012. The kallikrein–kinin-system in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and its role in tumour survival, invasion, migration and response to radiotherapy. *Oral Oncol.* 48, 1208–1219.
- Begg, A.C., Stewart, F.A., Vens, C., 2011. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat. Rev. Cancer* 11, 239–253.
- Bell, E.L., Klimova, T.A., Eisenbart, J., Moraes, C.T., Murphy, M.P., Budinger, G.R.S., Chandel, N.S., 2007. The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J. Cell Biol.* 177, 1029–1036.
- Benizri, E., Ginouvès, A., Berra, E., 2008. The magic of the hypoxia-signaling cascade. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1133–1149.
- Ben-Yosef, Y., Lahat, N., Shapiro, S., Bitterman, H., Miller, A., 2002. Regulation of Endothelial Matrix Metalloproteinase-2 by Hypoxia/Reoxygenation. *Circulation Research* 90, 784–791.
- Beppu, T., Kamada, K., Yoshida, Y., Arai, H., Ogasawara, K., Ogawa, A., 2002. Change of Oxygen Pressure in Glioblastoma Tissue Under Various Conditions. *Journal of neuro-oncology* 58, 47–52.
- Berra Edurne, Richard Darren E, Gothié Emmanuel, Pouysségur Jacques, 2001. HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS Letters* 491, 85–90.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D., Pouysségur, J., 2003. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *The EMBO Journal* 22, 4082–4090.
- Bertipaglia, C., Gonçalves, J.C., Vallee, R.B., 2017. Nuclear migration in mammalian brain development. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Bertout, J.A., Patel, S.A., Simon, M.C., 2008. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 967–975.
- Beug, H., 2009. Breast Cancer Stem Cells: Eradication by Differentiation Therapy? *Cell* 138, 623–625.
- Binello, E., Germano, I.M., 2011. Targeting glioma stem cells: A novel framework for brain tumors. *Cancer Science* 102, 1958–1966.
- Binh, N.H., Aoki, H., Takamatsu, M., Hatano, Y., Hirata, A., Tomita, H., Hara, A., 2014. Time-sensitive effects of hypoxia on differentiation of neural stem cells derived from mouse embryonic stem cells in vitro. *Neurol. Res.* 36, 804–813.
- Birner, P., Schindl, M., Obermair, A., Breiteneker, G., Oberhuber, G., 2001. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 7, 1661–1668.
- Biswas, S., Guix, M., Rinehart, C., Dugger, T.C., Chytil, A., Moses, H.L., Freeman, M.L., Arteaga, C.L., 2007. Inhibition of TGF- β with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression.(Research article). *Journal of Clinical Investigation*.
- Bizen, N., Inoue, T., Shimizu, T., Tabu, K., Kagawa, T., Taga, T., 2014. A growth-promoting signaling component cyclin D1 in neural stem cells has antiastroglial function to execute self-renewal. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 1602–1615.
- Bjornsson, C.S., Apostolopoulou, M., Tian, Y., Temple, S., 2015. It takes a village: constructing the neurogenic niche. *Dev. Cell* 32, 435–446.
- Borrell, V., Reillo, I., 2012. Emerging roles of neural stem cells in cerebral cortex development and evolution. *Dev. Neurobiol.* 72, 955–971.
- Bosch-Marce, M., Okuyama, H., Wesley, J.B., Sarkar, K., Kimura, H., Liu, Y.V., Zhang, H., Strazza, M., Rey, S., Savino, L., Zhou, Y.F., McDonald, K.R., Na, Y., Vandiver, S., Rabi, A., Shaked, Y.,

- Kerbel, R., Lavalley, T., Semenza, G.L., 2007. Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia. *Circ. Res.* 101, 1310–1318.
- Bracken, C.P., Fedele, A.O., Linke, S., Balrak, W., Lisy, K., Whitelaw, M.L., Peet, D.J., 2006. Cell-specific Regulation of Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α Stabilization and Transactivation in a Graded Oxygen Environment. *J. Biol. Chem.* 281, 22575–22585.
- Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., Beroukhi, R., Bernard, B., Wu, C.-J., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L., Vegesna, R., Shukla, S.A., Ciriello, G., Yung, W.K., Zhang, W., Sougnez, C., Mikkelsen, T., Aldape, K., Bigner, D.D., Van Meir, E.G., Prados, M., Sloan, A., Black, K.L., Eschbacher, J., Finocchiaro, G., Friedman, W., Andrews, D.W., Guha, A., Iacocca, M., O'Neill, B.P., Foltz, G., Myers, J., Weisenberger, D.J., Penny, R., Kucherlapati, R., Perou, C.M., Hayes, D.N., Gibbs, R., Marra, M., Mills, G.B., Lander, E., Spellman, P., Wilson, R., Sander, C., Weinstein, J., Meyerson, M., Gabriel, S., Laird, P.W., Haussler, D., Getz, G., Chin, L., TCGA Research Network, 2013. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462–477.
- Bruick, R.K., McKnight, S.L., 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337–1340.
- Brunelle, J.K., Chandel, N.S., 2002. Oxygen deprivation induced cell death: An update. *Apoptosis* 7, 475–482.
- Bulfone, A., Martinez, S., Marigo, V., Campanella, M., Basile, A., Quaderi, N., Gattuso, C., Rubenstein, J.L., Ballabio, A., 1999. Expression pattern of the *Tbr2* (Eomesodermin) gene during mouse and chick brain development. *Mech. Dev.* 84, 133–138.
- Bulfone, A., Smiga, S.M., Shimamura, K., Peterson, A., Puelles, L., Rubenstein, J.L., 1995. *T-brain-1*: a homolog of *Brachyury* whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. *Neuron* 15, 63–78.
- Bunn, H.F., Poyton, R.O., 1996. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol. Rev.* 76, 839–885.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitsch, B.G., Muhr, J., 2003. Vertebrate neurogenesis is counteracted by *Sox1–3* activity. *Nature Neuroscience* 6, 1162–1168.
- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., Huttner, W.B., 2005. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J. Neurosci* 25, 6533–6538.
- Calegari, F., Huttner, W.B., 2003. An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J. Cell. Sci.* 116, 4947–4955.
- Cambruzzi, E., 2017. The role of IDH1/2 mutations in the pathogenesis of secondary glioblastomas. *J. Bras. Patol. E Med. Lab.* 53, 338–344.
- Camphausen, K., Moses, M.A., Beecken, W.D., Khan, M.K., Folkman, J., O'Reilly, M.S., 2001. Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice. *Cancer Res.* 61, 2207–2211.
- Campos, B., Wan, F., Farhadi, M., Ernst, A., Zeppernick, F., Tagscherer, K.E., Ahmadi, R., Lohr, J., Dictus, C., Gdynia, G., Combs, S.E., Goidts, V., Helmke, B.M., Eckstein, V., Roth, W., Beckhove, P., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., Herold-Mende, C., 2010. Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 2715–2728.

- Canazza, A., Calatozzolo, C., Fumagalli, L., Bergantin, A., Ghielmetti, F., Fariselli, L., Croci, D., Salmaggi, A., Ciusani, E., 2011. Increased migration of a human glioma cell line after in vitro CyberKnife irradiation. *Cancer Biol. Ther.* 12, 629–633.
- Carbonaro, M., O’Brate, A., Giannakakou, P., 2011. Microtubule disruption targets HIF-1alpha mRNA to cytoplasmic P-bodies for translational repression. *J. Cell Biol.* 192, 83–99.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D., Keshert, E., Keshet, E., 1998. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394, 485–490.
- Catrina, S.-B., 2014. Impaired hypoxia-inducible factor (HIF) regulation by hyperglycemia. *J. Mol. Med.* 92, 1025–1034.
- Chandel, N.S., 2010. Mitochondrial regulation of oxygen sensing. *Adv. Exp. Med. Biol.* 661, 339–354.
- Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., Schumacker, P.T., 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11715–11720.
- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., Schumacker, P.T., 2000. Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor-1 α during Hypoxia A MECHANISM OF O₂ SENSING. *J. Biol. Chem.* 275, 25130–25138.
- Chargari, C., Moncharmont, C., Lévy, A., Guy, J.-B., Bertrand, G., Guilbert, M., Rousseau, C., Védrine, L., Alphonse, G., Toillon, R.-A., Rodriguez-Lafrasse, C., Deutsch, É., Magné, N., 2012. Facteurs de radio-résistance des cellules souches cancéreuses et perspectives de radiosensibilisation : l’exemple du glioblastome. *Bull. Cancer (Paris)* 99, 1153–1160.
- Charles, N., Holland, E.C., 2009. Brain tumor treatment increases the number of cancer stem-like cells. *Expert Rev. Neurother.* 9, 1447–1449.
- Chaudhry, F.A., Lehre, K.P., van Lookeren Campagne, M., Ottersen, O.P., Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J., 1995. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15, 711–720.
- Chen Y, Balasubramaniyan V, Peng J, Hurlock EC, Tallquist M, Li J, Lu QR(2007) Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc* 2:1044–1051.
- Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., Maity, A., 2001. Regulation of glut1 mRNA by Hypoxia-inducible Factor-1 INTERACTION BETWEEN H-ras AND HYPOXIA. *J. Biol. Chem.* 276, 9519–9525.
- Chen, D., Li, M., Luo, J., Gu, W., 2003. Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J. Biol. Chem.* 278, 13595–13598.
- Chen, E.Y., Fujinaga, M., Giaccia, A.J., 1999. Hypoxic microenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development. *Teratology* 60, 215–225.
- Cheng, J.C.-H., Chou, C.H., Kuo, M.L., Hsieh, C.-Y., 2006. Radiation-enhanced hepatocellular carcinoma cell invasion with MMP-9 expression through PI3K/Akt/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene* 25, 7009–7018.
- Cheng, L., Bao, S., Rich, J.N., 2010. Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem. Pharmacol., Targeted Cancer Therapy* 80, 654–665.
- Chenn, A., McConnell, S., 1995. Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82, 631–41.
- Chenn, A., Walsh, C.A., 2002. Regulation of Cerebral Cortical Size by Control of Cell Cycle Exit in Neural Precursors. *Science* 297, 365–369.

- Chi, J.-T., Wang, Z., Nuyten, D.S.A., Rodriguez, E.H., Schaner, M.E., Salim, A., Wang, Y., Kristensen, G.B., Helland, A., Børresen-Dale, A.-L., Giaccia, A., Longaker, M.T., Hastie, T., Yang, G.P., van de Vijver, M.J., Brown, P.O., 2006. Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med.* 3, e47.
- Chi, K.-H., Wang, Y.-S., Kao, S.-J., 2012. Improving Radioresponse Through Modification of the Tumor Immunological Microenvironment.
- Cho, Y.M., Kim, Y.S., Kang, M.J., Farrar, W.L., Hurt, E.M., 2012. Long-term recovery of irradiated prostate cancer increases cancer stem cells. *The Prostate* 72, 1746–1756.
- Choi, B.H., 1988. Prenatal gliogenesis in the developing cerebrum of the mouse. *Glia* 1, 308–316.
- Chou, C.H., Teng, C.-M., Tzen, K.-Y., Chang, Y.-C., Chen, J.-H., Cheng, J.C.-H., 2012. MMP-9 from sublethally irradiated tumor promotes Lewis lung carcinoma cell invasiveness and pulmonary metastasis. *Oncogene* 31, 458–468.
- Chuah, T.L., Walker, D.G., Wei, M., Scott, S., Lavin, M.F., 2012. Approaches to sensitizing glioblastoma to radiotherapy: Use of lentiviral vectors. *Int. J. Oncol.* 40, 1963–1969.
- Chun, Y.S., Yeo, E.J., Choi, E., Teng, C.M., Bae, J.M., Kim, M.S., Park, J.W., 2001. Inhibitory effect of YC-1 on the hypoxic induction of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in Hep3B cells. *Biochem. Pharmacol.* 61, 947–954.
- Ciani, L., Salinas, P.C., 2005. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 351–362.
- Cioffi, C.L., Liu, X.Q., Kosinski, P.A., Garay, M., Bowen, B.R., 2003. Differential regulation of HIF-1 alpha prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 947–953.
- Claes, A., Idema, A.J., Wesseling, P., 2007. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol* 114, 443–458.
- Clara, C.A., Marie, S.K.N., Almeida, J.R.W. de, Wakamatsu, A., Oba-Shinjo, S.M., Uno, M., Neville, M., Rosemberg, S., 2014. Angiogenesis and expression of PDGF-C, VEGF, CD105 and HIF-1 α in human glioblastoma. *Neuropathology* 34, 343–352.
- Cleaver, O., Dor, Y., 2012. Vascular instruction of pancreas development. *Dev. Camb. Engl.* 139, 2833–2843.
- Clottes, E., 2005. [Hypoxia-inducible factor 1: regulation, involvement in carcinogenesis and target for anticancer therapy]. *Bull. Cancer (Paris)* 92, 119–127.
- Collingridge, D.R., Piepmeyer, J.M., Rockwell, S., Knisely, J.P.S., 1999. Polarographic measurements of oxygen tension in human glioma and surrounding peritumoural brain tissue. *Radiother. Oncol.* 53, 127–131.
- Conrad, P.W., Freeman, T.L., Beitner-Johnson, D., Millhorn, D.E., 1999. EPAS1 transactivation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J. Biol. Chem.* 274, 33709–33713.
- Conway, E.M., Collen, D., Carmeliet, P., 2001. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49, 507–521.
- Coutts, A., Pires, I., Weston, L., Buffa, F., Milani, M., Li, J.-L., Harris, A., Hammond, E., B La Thangue, N., 2011. Hypoxia-driven cell motility reflects the interplay between JMY and HIF-1 α . *Oncogene* 30, 4835–42.
- Coutts, A.S., Boulahbel, H., Graham, A., Thangue, N.B.L., 2007. Mdm2 targets the p53 transcription cofactor JMY for degradation. *EMBO Rep.* 8, 84–90.
- Coutts, A.S., Weston, L., Thangue, N.B.L., 2009. A transcription co-factor integrates cell adhesion and motility with the p53 response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 19872–19877.
- Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.-J., Labosky, P.A., Simon, M.C., Keith, B., 2006. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 20, 557–570.

- Crews, S.T., 1998. Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* 12, 607–620.
- Cunningham, L.A., Candelario, K., Li, L., 2012. Roles for HIF-1 α in neural stem cell function and the regenerative response to stroke. *Behav. Brain Res.* 227, 410–417.
- D'Alessio, A., Proietti, G., Lama, G., Biamonte, F., Lauriola, L., Moscato, U., Vescovi, A., Mangiola, A., Angelucci, C., Sica, G., 2016. Analysis of angiogenesis related factors in glioblastoma, peritumoral tissue and their derived cancer stem cells. *Oncotarget* 7, 78541–78556.
- D'Souza-Schorey, C., 2005. Disassembling adherens junctions: breaking up is hard to do. *Trends Cell Biol.* 15, 19–26.
- Dahan, P., Martinez Gala, J., Delmas, C., Monferran, S., Malric, L., Zentkowski, D., Lubrano, V., Toulas, C., Cohen-Jonathan Moyal, E., Lemarie, A., 2014. Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis.* 5, e1543.
- Dallas, N.A., Fan, F., Gray, M.J., Van Buren, G., Lim, S.J., Xia, L., Ellis, L.M., 2007. Functional significance of vascular endothelial growth factor receptors on gastrointestinal cancer cells. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 433–441.
- Dang, C.V., Semenza, G.L., 1999. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 24, 68–72.
- Dang, E.V., Barbi, J., Yang, H.-Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H.-R., Luo, W., Zeller, K., Shimoda, L., Topalian, S.L., Semenza, G.L., Dang, C.V., Pardoll, D.M., Pan, F., 2011. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 146, 772–784.
- Daniel, D., Rossel, M., Seki, T., König, N., 2005. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) expression in embryonic mouse cerebral cortex starts in the intermediate zone close to the pallial-subpallial boundary and extends progressively towards the cortical hem. *Gene Expr. Patterns GEP* 5, 317–322.
- Dann, C.E., Bruick, R.K., Deisenhofer, J., 2002. Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway. *PROC. NAT. ACAD. OF SCI. (U.S.A.)*, Proceedings - National Academy of Science, U.S.A., Proceedings - National Academy of Sciences, USA, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99, 15351–15356.
- Dao, T., Moore, G.E., 1961. Clinical observations of conditions which apparently enhance malignant cell survival. *Surg Gynecol Obstet* 112, 191–195.
- DAUMAS-DUPORT, C., KOZIAK, M., MIQUEL, C., NATAF, F., JOUVET, A., VARLET, P., 2008. CLASSIFICATION DES OLIGODENDROGLIOMES DE L'HÔPITAL SAINTE-ANNE. *Datarevues0028377000513-4-C2247*.
- De Bacco, F., Luraghi, P., Medico, E., Reato, G., Girolami, F., Perera, T., Gabriele, P., Comoglio, P.M., Boccaccio, C., 2011. Induction of MET by Ionizing Radiation and Its Role in Radioresistance and Invasive Growth of Cancer. *J Natl Cancer Inst* 103, 645–661.
- De Filippis, L., Delia, D., 2011. Hypoxia in the regulation of neural stem cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 2831–2844.
- De Val, S., Black, B.L., 2009. Transcriptional control of endothelial cell development. *Dev. Cell* 16, 180–195.
- Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., Barton, M., 2005. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* 104, 1129–1137.

- Delaunay, D., Cortay, V., Patti, D., Knoblauch, K., Dehay, C., 2014. Mitotic Spindle Asymmetry: A Wnt/PCP-Regulated Mechanism Generating Asymmetrical Division in Cortical Precursors. *Cell Rep.* 6, 400–414.
- Deng, C.-X., Wang, R.-H., 2003. Roles of BRCA1 in DNA damage repair: a link between development and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 12 Spec No 1, R113-123.
- Dengler, V.L., Galbraith, M., Espinosa, J.M., 2014. Transcriptional Regulation by Hypoxia Inducible Factors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49, 1–15.
- Déry, M.-A.C., Michaud, M.D., Richard, D.E., 2005. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 535–540.
- Desgrosellier, J.S., Cheresch, D.A., 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 10, 9–22.
- Desmarais, G., Charest, G., Fortin, D., Bujold, R., Mathieu, D., Paquette, B., 2015. Cyclooxygenase-2 inhibitor prevents radiation-enhanced infiltration of F98 glioma cells in brain of Fischer rat. *Int. J. Radiat. Biol.* 91, 624–633.
- Dewhirst, M.W., Cao, Y., Moeller, B., 2008. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response., Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 8, 8, 425, 425–437.
- Diehn, M., Cho, R.W., Lobo, N.A., Kalisky, T., Dorie, M.J., Kulp, A.N., Qian, D., Lam, J.S., Ailles, L.E., Wong, M., Joshua, B., Kaplan, M.J., Wapnir, I., Dirbas, F.M., Somlo, G., Garberoglio, C., Paz, B., Shen, J., Lau, S.K., Quake, S.R., Brown, J.M., Weissman, I.L., Clarke, M.F., 2009. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 458, 780–783.
- Doetsch, F., 2003. The glial identity of neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 6, 1127–1134.
- Dong, Z., Su, L., Mino, J., 2007. [Effects of endothelial cells on renewal and differentiation of neural stem cells]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi J. Biomed. Eng. Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 24, 1184–1186.
- Dong, Z., Zhou, L., Han, N., Zhang, M., Lyu, X., 2015. Wnt/ β -catenin pathway involvement in ionizing radiation-induced invasion of U87 glioblastoma cells. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft A1* 191, 672–680.
- Du, J., Xu, R., Hu, Z., Tian, Y., Zhu, Y., Gu, L., Zhou, L., 2011. PI3K and ERK-Induced Rac1 Activation Mediates Hypoxia-Induced HIF-1 α Expression in MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLOS ONE* 6, e25213.
- Dunwoodie, S.L., 2009. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev. Cell* 17, 755–773.
- Durante, M., Loeffler, J.S., 2010. Charged particles in radiation oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 37–43.
- Eckhart, A.D., Yang, N., Xin, X., Faber, J.E., 1997. Characterization of the α 1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *PNAS* 94, 9487–9492.
- Eguchi, H., Ikuta, T., Tachibana, T., Yoneda, Y., Kawajiri, K., 1997. A Nuclear Localization Signal of Human Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator/Hypoxia-inducible Factor 1 β Is a Novel Bipartite Type Recognized by the Two Components of Nuclear Pore-targeting Complex. *J. Biol. Chem.* 272, 17640–17647.
- Elkins, J.M., Hewitson, K.S., McNeill, L.A., Seibel, J.F., Schlemminger, I., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Schofield, C.J., 2003. Structure of Factor-inhibiting Hypoxia-inducible Factor (HIF) Reveals Mechanism of Oxidative Modification of HIF-1 α . *J. Biol. Chem.* 278, 1802–1806.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., Fujii-Kuriyama, Y., 1997. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the

- VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4273–4278.
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R.A.M., Bulfone, A., Kowalczyk, T., Hevner, R.F., 2005. Pax6, Tbr2, and Tbr1 Are Expressed Sequentially by Radial Glia, Intermediate Progenitor Cells, and Postmitotic Neurons in Developing Neocortex. *J. Neurosci.* 25, 247–251.
- Episkopou, V., 2005. SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends in Neurosciences* 28, 219–221.
- Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J., 2001. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 43–54.
- Estivill-Torrus, G., Pearson, H., Heyningen, V. van, Price, D.J., Rashbass, P., 2002. Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development* 129, 455–466.
- Etienne, O., Bery, A., Roque, T., Desmaze, C., Boussin, F.D., 2014. Assessing Cell Cycle Progression of Neural Stem and Progenitor Cells in the Mouse Developing Brain after Genotoxic Stress. *JoVE J. Vis. Exp.* e51209–e51209.
- Etienne, O., Roque, T., Haton, C., Boussin, F.D., 2012. Variation of radiation-sensitivity of neural stem and progenitor cell populations within the developing mouse brain. *Int. J. Radiat. Biol.* 88, 694–702.
- Evans, S., D Judy, K., Dunphy, I., Jenkins, W., T Nelson, P., Collins, R., Wileyto, E., Jenkins, K., M Hahn, S., W Stevens, C., R Judkins, A., Phillips, P., Georger, B., J Koch, C., 2004. Comparative Measurements of Hypoxia in Human Brain Tumors Using Needle Electrodes and EF5 Binding. *Cancer research* 64, 1886–92.
- Evans, S., Jenkins, K., Jenkins, W., Dilling, T., D Judy, K., Schrlau, A., Judkins, A., M Hahn, S., J Koch, C., 2009. Imaging and Analytical Methods as Applied to the Evaluation of Vasculature and Hypoxia in Human Brain Tumors. *Radiation research* 170, 677–90.
- Ezashi, T., Das, P., Roberts, R.M., 2005. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 4783–4788.
- F von Essen, C., 1991. Radiation enhancement of metastasis: A review.
- Falk, A.T., Moncharmont, C., Guilbert, M., Guy, J.-B., Alphonse, G., Trone, J.-C., Rivoirard, R., Gilormini, M., Toillon, R.-A., Rodriguez-Lafrasse, C., Magné, N., 2014. La radiothérapie induit-elle une agressivité accrue des cellules tumorales du glioblastome? *Bull. Cancer (Paris)* 101, 876–880.
- Falk, A.T., Moncharmont, C., Guilbert, M., Guy, J.-B., Alphonse, G., Trone, J.-C., Rivoirard, R., Gilormini, M., Toillon, R.-A., Rodriguez-Lafrasse, C., Magné, N., 2014. La radiothérapie induit-elle une agressivité accrue des cellules tumorales du glioblastome? *Bulletin du Cancer* 101, 876–880.
- Fan, X., Khaki, L., Zhu, T.S., Soules, M.E., Talsma, C.E., Gul, N., Koh, C., Zhang, J., Li, Y.-M., Maciaczyk, J., Nikkhah, G., Dimeco, F., Piccirillo, S., Vescovi, A.L., Eberhart, C.G., 2010. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 5–16.
- Farkas, L.M., Huttner, W.B., 2008. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr Opin Cell Biol* 20, 707–715.
- Fehlauer, F., Muench, M., Richter, E., Rades, D., 2007. The inhibition of proliferation and migration of glioma spheroids exposed to temozolomide is less than additive if combined with irradiation. *Oncology reports* 17, 941–5.

- Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G., Semenza, G.L., 1999. Reciprocal Positive Regulation of Hypoxia-inducible Factor 1 α and Insulin-like Growth Factor 2. *Cancer Res* 59, 3915–3918.
- Fels, D.R., Koumenis, C., 2005. HIF-1 α and p53: the ODD couple? *Trends in Biochemical Sciences* 30, 426–429.
- Ferent, J., Cochard, L., Faure, H., Taddei, M., Hahn, H., Ruat, M., Traiffort, E., 2014. Genetic Activation of Hedgehog Signaling Unbalances the Rate of Neural Stem Cell Renewal by Increasing Symmetric Divisions. *Stem Cell Rep.* 3, 312–323.
- Fernandes, M., Gutin, G., Alcorn, H., McConnell, S.K., Hébert, J.M., 2007. Mutations in the BMP pathway in mice support the existence of two molecular classes of holoprosencephaly. *Development* 134, 3789–3794.
- Fernández, V., Llinares-Benadero, C., Borrell, V., 2016. Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned? *EMBO J.* 35, 1021–1044.
- Fietz, S.A., Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Bräuninger, M., Stenzel, D., Fish, J.L., Corbeil, D., Riehn, A., Distler, W., Nitsch, R., Huttner, W.B., 2010. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat. Neurosci.* 13, 690–699.
- Filippis, L.D., Delia, D., 2011. Hypoxia in the regulation of neural stem cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2831–2844.
- Fish, J.L., Dehay, C., Kennedy, H., Huttner, W.B., 2008. Making bigger brains—the evolution of neural-progenitor-cell division. *J. Cell Sci.* 121, 2783–2793.
- Flames, N., Pla, R., Gelman, D.M., Rubenstein, J.L.R., Puellas, L., Marín, O., 2007. Delineation of Multiple Subpallial Progenitor Domains by the Combinatorial Expression of Transcriptional Codes. *J. Neurosci.* 27, 9682–9695.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G.L., 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4604–4613.
- Fougerousse, F., Bullen, P., Herasse, M., Lindsay, S., Richard, I., Wilson, D., Suel, L., Durand, M., Robson, S., Abitbol, M., Beckmann, J.S., Strachan, T., 2000. Human–mouse differences in the embryonic expression patterns of developmental control genes and disease genes. *Hum. Mol. Genet.* 9, 165–173.
- Franco, S.J., Müller, U., 2013. Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron* 77, 19–34.
- Frederiksen, K., McKay, R.D., 1988. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J. Neurosci.* 8, 1144–1151.
- Freedman, S.J., Sun, Z.-Y.J., Poy, F., Kung, A.L., Livingston, D.M., Wagner, G., Eck, M.J., 2002. Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5367–5372.
- Fujita, M., Otsuka, Y., Yamada, S., Iwakawa, M., Imai, T., 2011. X-ray irradiation and Rho-kinase inhibitor additively induce invasiveness of the cells of the pancreatic cancer line, MIAPaCa-2, which exhibits mesenchymal and amoeboid motility. *Cancer Sci.* 102, 792–798.
- Fujita, M., Yamada, S., Imai, T., 2015. Irradiation induces diverse changes in invasive potential in cancer lines.
- Fujiwara, S., Nakagawa, K., Harada, H., Nagato, S., Furukawa, K., Teraoka, M., Seno, T., Oka, K., Iwata, S., Ohnishi, T., 2007. Silencing hypoxia-inducible factor-1 α inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. *International Journal of Oncology* 30, 793–802.

- Furmanova-Hollenstein, P., Broggin-Tenzer, A., Eggel, M., Millard, A.-L., Pruschy, M., 2013. The microtubule stabilizer paupilone counteracts ionizing radiation-induced matrix metalloproteinase activity and tumor cell invasion. *Radiat. Oncol.* 8, 105.
- Gal, J.S., Morozov, Y.M., Ayoub, A.E., Chatterjee, M., Rakic, P., Haydar, T.F., 2006. Molecular and Morphological Heterogeneity of Neural Precursors in the Mouse Neocortical Proliferative Zones. *J. Neurosci.* 26, 1045–1056.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., Vitis, S.D., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., Vescovi, A., 2004. Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. *Cancer Res* 64, 7011–7021.
- Gammill, L.S., Bronner-Fraser, M., 2003. Neural crest specification: Migrating into genomics. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 795–805.
- Gan, Q., Lee, A., Suzuki, R., Yamagami, T., Stokes, A., Nguyen, B.C., Pleasure, D., Wang, J., Chen, H., Zhou, C.J., 2014. Pax6 Mediates β -Catenin Signaling for Self-Renewal and Neurogenesis by Neocortical Radial Glial Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 45–58.
- Gan, Q., Lee, A., Suzuki, R., Yamagami, T., Stokes, A., Nguyen, B.C., Pleasure, D., Wang, J., Chen, H., Zhou, C.J., 2014. Pax6 Mediates β -Catenin Signaling for Self-Renewal and Neurogenesis by Neocortical Radial Glial Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 45–58.
- Gangemi Rosaria Maria Rita, Griffero Fabrizio, Marubbi Daniela, Perera Marzia, Capra Maria Cristina, Malatesta Paolo, Ravetti Gian Luigi, Zona Gian Luigi, Daga Antonio, Corte Giorgio, 2009. SOX2 Silencing in Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Causes Stop of Proliferation and Loss of Tumorigenicity. *STEM CELLS* 27, 40–48.
- Gao, P., Zhang, H., Dinavahi, R., Li, F., Xiang, Y., Raman, V., Bhujwala, Z.M., Felsher, D.W., Cheng, L., Pevsner, J., Lee, L.A., Semenza, G.L., Dang, C.V., 2007. HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell* 12, 230–238.
- Ghisolfi, L., Keates, A.C., Hu, X., Lee, D., Li, C.J., 2012. Ionizing Radiation Induces Stemness in Cancer Cells. *PLoS ONE* 7.
- Ghosh, S., Kumar, A., Tripathi, R.P., Chandna, S., 2014. Connexin-43 regulates p38-mediated cell migration and invasion induced selectively in tumour cells by low doses of γ -radiation in an ERK-1/2-independent manner. *Carcinogenesis* 35, 383–395.
- Gilbertson, R.J., Rich, J.N., 2007. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat. Rev. Cancer* 7, 733–736.
- Gillespie, D.L., Whang, K., Ragel, B.T., Flynn, J.R., Kelly, D.A., Jensen, R.L., 2007. Silencing of Hypoxia Inducible Factor-1 α by RNA Interference Attenuates Human Glioma Cell Growth In vivo. *Clin. Cancer Res.* 13, 2441–2448.
- Gilmore, E.C., Herrup, K., 1997. Cortical development: layers of complexity. *Curr. Biol. CB* 7, R231-234.
- Gingras, A.C., Raught, B., Sonenberg, N., 2001. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 15, 807–826.
- Giordano, F.J., Johnson, R.S., 2001. Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 35–40.
- Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.-L., Guillemot, F., Dragatsis, I., Bellaïche, Y., Saudou, F., Nguyen, L., Humbert, S., 2010. Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67, 392–406.
- Goellner, E.M., Grimme, B., Brown, A.R., Lin, Y.-C., Wang, X.-H., Sugrue, K.F., Mitchell, L., Trivedi, R.N., Tang, J., Sobol, R.W., 2011. Overcoming temozolomide resistance in glioblastoma via dual inhibition of NAD⁺ biosynthesis and base excision repair. *Cancer Res.* 71, 2308–2317.

- Goetze, K., Scholz, M., Taucher-Scholz, G., Mueller-Klieser, W., 2007. The impact of conventional and heavy ion irradiation on tumor cell migration in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* 83, 889–896.
- Gogineni, V.R., Nalla, A.K., Gupta, R., Gujrati, M., Klopfenstein, J.D., Mohanam, S., Rao, J.S., 2011. $\alpha 3\beta 1$ integrin promotes radiation-induced migration of meningioma cells., $\alpha 3\beta 1$ Integrin Promotes Radiation-induced Migration of Meningioma Cells. *Int J Oncol* 38, 38, 1615, 1615–1624.
- Gómez-lópez, S., Wiskow, O., Favaro, R., Nicolis, S.K., Price, D.J., Pollard, S.M., Smith, A., 2011. sox2 and Pax6 maintain the proliferative and developmental potential of gliogenic neural stem cells in vitro. *Glia* 59, 1588–1599.
- Goodenberger, M.L., Jenkins, R.B., 2012. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet.* 205, 613–621.
- Gordan, J.D., Bertout, J.A., Hu, C.-J., Diehl, J.A., Simon, M.C., 2007a. HIF-2 α Promotes Hypoxic Cell Proliferation by Enhancing c-Myc Transcriptional Activity. *Cancer Cell* 11, 335–347.
- Gordan, J.D., Thompson, C.B., Simon, M.C., 2007b. HIF and c-Myc: Sibling Rivals for Control of Cancer Cell Metabolism and Proliferation. *Cancer Cell* 12, 108–113.
- Gottschald, O., Malec, V., Krasteva, G., Hasan, D., Subtil, F., Herold, S., Rose, F., Seeger, W., Hänze, J., 2010. TIAR and TIA-1 mRNA-Binding Proteins Co-aggregate under Conditions of Rapid Oxygen Decline and Extreme Hypoxia and Suppress the HIF-1{ α } Pathway. *Journal of Molecular Cell Biology* 2, 345–56.
- Götz, M., Barde, Y.-A., 2005. Radial Glial Cells Defined and Major Intermediates between Embryonic Stem Cells and CNS Neurons.
- Götz, M., Huttner, W.B., 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 777–788.
- Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R.H., Kvietikova, I., Whitelaw, M.L., Toftgård, R., Tora, L., Gassmann, M., Poellinger, L., 1996. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 16, 5221–5231.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., Pevny, L., 2003. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39, 749–765.
- Grimshaw, M.J., 2007. Endothelins and hypoxia-inducible factor in cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 14, 233–244.
- Gross, C.G., 2000. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 67–73.
- Gu, Q., He, Y., Ji, J., Yao, Y., Shen, W., Luo, J., Zhu, W., Cao, H., Geng, Y., Xu, J., Zhang, S., Cao, J., Ding, W.-Q., 2015. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and reactive oxygen species (ROS) mediates radiation-induced invasiveness through the SDF-1 α /CXCR4 pathway in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncotarget* 6, 10893–10907.
- Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L., Bradfield, C.A., 1998. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expr.* 7, 205–213.
- Gudas, L.J., Wagner, J.A., n.d. Retinoids regulate stem cell differentiation. *J. Cell. Physiol.* 226, 322–330.
- Guillemot, F., 2005. Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. *Current Opinion in Cell Biology, Cell division, growth and death / Cell differentiation* 17, 639–647.
- Gunaratnam, L., Morley, M., Franovic, A., de Paulsen, N., Mekhail, K., Parolin, D.A.E., Nakamura, E., Lorimer, I.A.J., Lee, S., 2003. Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL(-/-) renal cell carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 278, 44966–44974.
- Gupta, A., Tsai, L.-H., Wynshaw-Boris, A., 2002. Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 342–355.

- Gupta, T., 2016. Resistance mechanisms in glioblastoma stem cells: finding opportunities in challenges. *Translational Cancer Research* 5, S738–S741.
- Gurley, L.R., D’Anna, J.A., Barham, S.S., Deaven, L.L., Tobey, R.A., 1978. Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur. J. Biochem.* 84, 1–15.
- Gustafsson, M.V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J.L., Poellinger, L., Lendahl, U., Bondesson, M., 2005. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 9, 617–628.
- Haigh, J.J., Morelli, P.I., Gerhardt, H., Haigh, K., Tsien, J., Damert, A., Miquerol, L., Muhlner, U., Klein, R., Ferrara, N., Wagner, E.F., Betsholtz, C., Nagy, A., 2003. Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Dev. Biol.* 262, 225–241.
- Halterman, M.W., Federoff, H.J., 1999a. HIF-1alpha and p53 promote hypoxia-induced delayed neuronal death in models of CNS ischemia. *Exp. Neurol.* 159, 65–72.
- Halterman, M.W., Miller, C.C., Federoff, H.J., 1999b. Hypoxia-Inducible Factor-1 α Mediates Hypoxia-Induced Delayed Neuronal Death That Involves p53. *J. Neurosci.* 19, 6818–6824.
- Han, W., Kwan, K.Y., Shim, S., Lam, M.M.S., Shin, Y., Xu, X., Zhu, Y., Li, M., Sestan, N., 2011. TBR1 directly represses Fezf2 to control the laminar origin and development of the corticospinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 3041–3046.
- Han, X., Xue, X., Zhou, H., Zhang, G., Han, X., Xue, X., Zhou, H., Zhang, G., 2017. A molecular view of the radioresistance of gliomas. *Oncotarget* 8, 100931–100941.
- Hansen, D.V., Lui, J.H., Parker, P.R.L., Kriegstein, A.R., 2010. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464, 554–561.
- Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., Imura, N., 2001. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 808–813.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., Götz, M., 2001. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev. Biol.* 229, 15–30.
- Hashimoto, T., Shibasaki, F., 2015. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch. *Front. Pediatr.* 3, 33.
- Hatten, M.E., 1999. Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 511–539.
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., Huttner, W.B., 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 3196–3201.
- Haydar, T.F., Ang, E., Rakic, P., 2003. Mitotic spindle rotation and mode of cell division in the developing telencephalon. *PNAS* 100, 2890–2895.
- Hébert, J.M., Mishina, Y., McConnell, S.K., 2002. BMP signaling is required locally to pattern the dorsal telencephalic midline. *Neuron* 35, 1029–1041.
- Heddleston, J.M., Li, Z., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., Rich, J.N., 2009. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 8, 3274–3284.
- Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E.C., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., Stupp, R., 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 997–1003.
- Hegi, M.E., Liu, L., Herman, J.G., Stupp, R., Wick, W., Weller, M., Mehta, M.P., Gilbert, M.R., 2008. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J. Clin. Oncol.* 26, 4189–4199.

- Heidbreder, M., Fröhlich, F., Jöhren, O., Dendorfer, A., Qadri, F., Dominiak, P., 2003. Hypoxia rapidly activates HIF-3 α mRNA expression. *FASEB J.* 17, 1541–1543.
- Helczynska, K., Kronblad, Å., Jögi, A., Nilsson, E., Beckman, S., Landberg, G., Pahlman, S., 2003. Hypoxia Promotes a Dedifferentiated Phenotype in Ductal Breast Carcinoma in Situ. *Cancer Res.* 63, 1441–1444.
- Hellwig-Bürgel, T., Stiehl, D.P., Wagner, A.E., Metzen, E., Jelkmann, W., 2005. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J. Interferon Cytokine Res.* 25, 297–310.
- Hevner, R.F., Hodge, R.D., Daza, R.A.M., Englund, C., 2006. Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neurosci. Res.* 55, 223–233.
- Hevner, R.F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y., Sheng, M., Smiga, S., Bulfone, A., Goffinet, A.M., Campagnoni, A.T., Rubenstein, J.L., 2001. *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29, 353–366.
- Hielscher, A., Gerecht, S., 2014. Hypoxia and free radicals: Role in tumor progression and the use of engineering-based platforms to address these relationships. *Free radical biology & medicine* 79.
- Hirabayashi, Y., Gotoh, Y., 2005. Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain. *Neurosci. Res.* 51, 331–336.
- Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N., Gotoh, Y., 2004. The Wnt/ β -catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131, 2791–2801.
- Hitoshi, S., Alexson, T., Tropepe, V., Donoviel, D., Elia, A.J., Nye, J.S., Conlon, R.A., Mak, T.W., Bernstein, A., van der Kooy, D., 2002. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev.* 16, 846–858.
- Hitoshi, S., Seaberg, R.M., Kosciuk, C., Alexson, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Tsuji, S., van der Kooy, D., 2004. Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev.* 18, 1806–1811.
- Ho, I.A.W., Shim, W.S.N., 2017. Contribution of the Microenvironmental Niche to Glioblastoma Heterogeneity [WWW Document]. *BioMed Research International*.
- Ho, J.-N., Kang, G.Y., Lee, S.-S., Kim, J., Bae, I.H., Hwang, S.-G., Um, H.-D., 2010. Bcl-XL and STAT3 mediate malignant actions of gamma-irradiation in lung cancer cells. *Cancer Sci.* 101, 1417–1423.
- Hockfield, S., McKay, R.D., 1985. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* 5, 3310–3328.
- Hofer, T., Wenger, H., Gassmann, M., 2002. Oxygen sensing, HIF-1 α stabilization and potential therapeutic strategies. *Pflugers Arch.* 443, 503–507.
- Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A., Hankinson, O., 1991. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252, 954–958.
- Hong, S.W., Hur, W., Choi, J.E., Kim, J.-H., Hwang, D., Yoon, S.K., 2016. Role of ADAM17 in invasion and migration of CD133-expressing liver cancer stem cells after irradiation. *Oncotarget* 7, 23482–23497.
- Hoshino, K., Matsuzawa, T., Murakami, U., 1973. Characteristics of the cell cycle of matrix cells in the mouse embryo during histogenesis of telencephalon. *Exp. Cell Res.* 77, 89–94.
- Hsieh, C.H., Shyu, W.C., Chiang, C.Y., Kuo, J.W., Shen, W.C., Liu, R.S., 2011. NADPH oxidase subunit 4-mediated reactive oxygen species contribute to cycling hypoxia-promoted tumor progression in glioblastoma multiforme. *PLoS ONE* 6, e23945.
- Hsu, L.-C., White, R.L., 1998. BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 12983–12988.

- Hu, J., Discher, D.J., Bishopric, N.H., Webster, K.A., 1998. Hypoxia Regulates Expression of the Endothelin-1 Gene through a Proximal Hypoxia-Inducible Factor-1 Binding Site on the Antisense Strand. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 245, 894–899.
- Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S.M., Lee, F.S., 2002. Sequence Determinants in Hypoxia-inducible Factor-1 α for Hydroxylation by the Prolyl Hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J. Biol. Chem.* 277, 39792–39800.
- Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., Bunn, H.F., 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. Am.* 95, 95, 7987, 7987–7992.
- Huang, Y., Yu, J., Yan, C., Hou, J., Pu, J., Zhang, G., Fu, Z., Wang, X., 2011. Effect of Small Interfering RNA Targeting Hypoxia-inducible Factor-1 α on Radiosensitivity of PC3 Cell Line. *Urology* 79, 744.e17–24.
- Hubenak, J.R., Zhang, Q., Branch, C.D., Kronowitz, S.J., 2014. Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. *Plast Reconstr Surg* 133, 49e-56e.
- Hutton, S.R., Pevny, L.H., 2011. SOX2 expression levels distinguish between neural progenitor populations of the developing dorsal telencephalon. *Dev. Biol.* 352, 40–47.
- Hwang, S.-Y., Jung, J.-W., Jeong, J.-S., Kim, Y.-J., Oh, E.-S., Kim, T.H., Kim, J.-Y., Cho, K., Han, I.-O., 2006. Dominant-negative Rac increases both inherent and ionizing radiation-induced cell migration in C6 rat glioma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer.*
- Ignatova Tatyana N., Kukekov Valery G., Laywell Eric D., Suslov Oleg N., Vrionis Frank D., Steindler Dennis A., 2002. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39, 193–206.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., Kageyama, R., 2010. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 3489–3498.
- Insolera, R., Bazzi, H., Shao, W., Anderson, K.V., Shi, S.-H., 2014. Cortical neurogenesis in the absence of centrioles. *Nat. Neurosci.* 17, 1528–1535.
- Isaacs, J.S., Jung, Y.-J., Mimnaugh, E.G., Martinez, A., Cuttitta, F., Neckers, L.M., 2002. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 α -degradative pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 29936–29944.
- Ishihara, S., Haga, H., Yasuda, M., Mizutani, T., Kawabata, K., Shirato, H., Nishioka, T., 2010. Integrin β 1-dependent invasive migration of irradiation-tolerant human lung adenocarcinoma cells in 3D collagen matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 651–655.
- Ishikawa, Y., Yamamoto, N., Yoshimoto, M., Ito, H., 2012. The primary brain vesicles revisited: are the three primary vesicles (forebrain/midbrain/hindbrain) universal in vertebrates? *Brain. Behav. Evol.* 79, 75–83.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., Jr, W.G.K., 2001. HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing. *Science* 292, 464–468.
- Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., Semenza, G.L., 1998. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 12, 149–162.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., 2001. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468–472.

- Jain, S., Maltepe, E., Lu, M.M., Simon, C., Bradfield, C.A., 1998. Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 α , HIF2 α and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mechanisms of Development* 73, 117–123.
- Jamal, M., Rath, B.H., Tsang, P.S., Camphausen, K., Tofilon, P.J., 2012. The Brain Microenvironment Preferentially Enhances the Radioresistance of CD133+ Glioblastoma Stem-like Cells. *Neoplasia* 14, 150–158.
- Jauniaux, E., Watson, A., Ozturk, O., Quick, D., Burton, G., 1999. In-vivo measurement of intrauterine gases and acid–base values early in human pregnancy. *Hum. Reprod.* 14, 2901–2904.
- Jeanes, A., Gottardi, C., Yap, A., 2008. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 27, 6920–6929.
- Jeitany, M., Pineda, J.R., Liu, Q., Porreca, R.M., Hoffschir, F., Desmaze, C., Silvestre, D.C., Mailliet, P., Junier, M.-P., Londoño-Vallejo, A., Ségal-Bendirdjian, E., Chneiweiss, H., Boussin, F.D., 2015. A preclinical mouse model of glioma with an alternative mechanism of telomere maintenance (ALT). *Int. J. Cancer* 136, 1546–1558.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J., Kim, K.W., 2002. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111, 709–720.
- Jewell, U.R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R.H., Gassmann, M., 2001. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *The FASEB Journal* 15, 1312–1314.
- Jiang, B.H., Jiang, G., Zheng, J.Z., Lu, Z., Hunter, T., Vogt, P.K., 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ.* 12, 363–369.
- Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R., Semenza, G.L., 1996. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 271, 17771–17778.
- Jiang, B.-H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R., Semenza, G.L., 1997. Transactivation and Inhibitory Domains of Hypoxia-inducible Factor 1 α MODULATION OF TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY BY OXYGEN TENSION. *J. Biol. Chem.* 272, 19253–19260.
- Jiao, S., Liu, Y., Yao, Y., Teng, J., 2017. miR-124 promotes proliferation and differentiation of neuronal stem cells through inactivating Notch pathway. *Cell Biosci* 7.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., Greenberg, D.A., 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11946–11950.
- Jin, K.L., Mao, X.O., Greenberg, D.A., 2000. Vascular endothelial growth factor: Direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10242–10247.
- Jögi, A., Øra, I., Nilsson, H., Poellinger, L., Axelson, H., Pählman, S., 2003. Hypoxia-induced dedifferentiation in neuroblastoma cells. *Cancer Lett.* 197, 145–150.
- Johansson, P.A., Cappello, S., Götz, M., 2010. Stem cells niches during development--lessons from the cerebral cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 400–407.
- Jones, E.G., 1994. Santiago Ramón y Cajal and the Croonian Lecture, March 1894. *Trends Neurosci.* 17, 190–192.
- Joseph, J.V., Conroy, S., Pavlov, K., Sontakke, P., Tomar, T., Eggens-Meijer, E., Balasubramanian, V., Wagemakers, M., Dunnen, W.F.A. den, Kruyt, F.A.E., 2015. Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1 α –ZEB1 axis. *Cancer Letters* 359, 107–116.
- Joško, J., Gwózdź, B., Jedrzejowska-Szypułka, H., Hendryk, S., 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med. Sci. Monit.* 6, 1047–1052.
- Joukov, V., Groen, A.C., Prokhorova, T., Gerson, R., White, E., Rodriguez, A., Walter, J.C., Livingston, D.M., 2006. The BRCA1/BARD1 Heterodimer Modulates Ran-Dependent Mitotic Spindle Assembly. *Cell* 127, 539–552.

- Jung, J.-W., Hwang, S.-Y., Hwang, J.-S., Oh, E.-S., Park, S., Han, I.-O., 2007. Ionising radiation induces changes associated with epithelial-mesenchymal transdifferentiation and increased cell motility of A549 lung epithelial cells. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 43, 1214–24.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., Imayoshi, I., 2008. Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nat. Neurosci.* 11, 1247–1251.
- Kallio, P., J. Wilson, W., O'Brien, S., Makino, Y., Poellinger, L., 1999. Regulation of the Hypoxia-inducible Transcription Factor 1 by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *The Journal of biological chemistry* 274, 6519–25.
- Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., Poellinger, L., 1998. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J* 17, 6573, 6573–6586.
- Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420–1428.
- Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R.C., Conaway, J.W., 2000. Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10430–10435.
- Kang, M.-K., Kang, S.-K., 2007. Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma. *Stem Cells Dev.* 16, 837–847.
- Kaplan, H.S., Murphy, E.D., 1949. The effect of local roentgen irradiation on the biological behavior of a transplantable mouse carcinoma; increased frequency of pulmonary metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 9, 407–413.
- Karsy, M., Albert, L., Tobias, M.E., Murali, R., Jhanwar-Uniyal, M., 2010. All-trans Retinoic Acid Modulates Cancer Stem Cells of Glioblastoma Multiforme in an MAPK-dependent Manner. *Anticancer Res.* 30, 4915–4920.
- Kaur, B., Khwaja, F., A Severson, E., Matheny, S., Brat, D., Van Meir, E., 2005. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG.. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* 7: 134-153.
- Ke, Q., Costa, M., 2006. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* 70, 1469–1480.
- Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., Anderson, P., 1999. RNA-Binding Proteins Tia-1 and Tiar Link the Phosphorylation of Eif-2 α to the Assembly of Mammalian Stress Granules. *The Journal of Cell Biology* 147, 1431–1442.
- Keith, B., Johnson, R.S., Simon, M.C., 2011. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* 12, 9–22.
- Kennedy, S.G., Wagner, A.J., Conzen, S.D., Jordán, J., Bellacosa, A., Tschlis, P.N., Hay, N., 1997. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.* 11, 701–713.
- Kenneth, N.S., Rocha, S., 2008. Regulation of gene expression by hypoxia. *Biochemical Journal* 414, 19–29.
- Kessler, J., Hahnel, A., Wichmann, H., Rot, S., Kappler, M., Bache, M., Vordermark, D., 2010. HIF-1 α inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression. *BMC Cancer* 10, 605.
- Kietzmann, T., Görlach, A., 2005. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Biology of Hypoxia and Myogenesis and Muscle Disease* 16, 474–486.
- Kietzmann, T., Roth, U., Jungermann, K., 1999. Induction of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Expression by Mild Hypoxia Via a Hypoxia Response Element Binding the Hypoxia-Inducible Factor-1 in Rat Hepatocytes. *Blood* 94, 4177–4185.

- Kim, J.Y., Lee, J.S., Hwang, H.S., Lee, D.R., Park, C.-Y., Jung, S.J., You, Y.R., Kim, D.-S., Kim, D.-W., 2018. Wnt signal activation induces midbrain specification through direct binding of the beta-catenin/TCF4 complex to the EN1 promoter in human pluripotent stem cells. *Exp. Mol. Med.* 50, 24.
- Kim, M.-J., Kim, R.-K., Yoon, C.-H., An, S., Hwang, S.-G., Suh, Y., Park, M.-J., Chung, H.Y., Kim, I.G., Lee, S.-J., 2011. Importance of PKC δ signaling in fractionated-radiation-induced expansion of glioma-initiating cells and resistance to cancer treatment. *J Cell Sci* 124, 3084–3094.
- Kim, M.S., Kwon, H.J., Lee, Y.M., Baek, J.H., Jang, J.-E., Lee, S.-W., Moon, E.-J., Kim, H.-S., Lee, S.-K., Chung, H.Y., Kim, C.W., Kim, K.-W., 2001. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nature Medicine* 7, 437–443.
- Kim, Y.-H., Yoo, K.-C., Cui, Y.-H., Uddin, N., Lim, E.-J., Kim, M.-J., Nam, S.-Y., Kim, I.-G., Suh, Y., Lee, S.-J., 2014. Radiation promotes malignant progression of glioma cells through HIF-1 α stabilization. *Cancer Lett.* 354, 132–141
- Kimbro, K.S., Simons, J.W., 2006. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 13, 739–749.
- Kirby, E.D., Kuwahara, A.A., Messer, R.L., Wyss-Coray, T., 2015. Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 4128–4133.
- Kline, D.D., Peng, Y.-J., Manalo, D.J., Semenza, G.L., Prabhakar, N.R., 2002. Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 α . *PNAS* 99, 821–826.
- Koivunen, P., Hirsilä, M., Günzler, V., Kivirikko, K.I., Myllyharju, J., 2004. Catalytic Properties of the Asparaginyl Hydroxylase (FIH) in the Oxygen Sensing Pathway Are Distinct from Those of Its Prolyl 4-Hydroxylases. *J. Biol. Chem.* 279, 9899–9904.
- Kojima, H., Gu, H., Nomura, S., Caldwell, C.C., Kobata, T., Carmeliet, P., Semenza, G.L., Sitkovsky, M.V., 2002. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1 α -deficient chimeric mice. *PNAS* 99, 2170–2174.
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., Matsuzaki, F., 2008. Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* 10, 93–101.
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., Matsuzaki, F., 2008. Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* 10, 93–101.
- Korhonen, L., Brännvall, K., Skoglösa, Y., Lindholm, D., 2003. Tumor suppressor gene BRCA-1 is expressed by embryonic and adult neural stem cells and involved in cell proliferation. *J. Neurosci. Res.* 71, 769–776.
- Kosodo, Y., Huttner, W.B., 2009. Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain. *Dev. Growth Differ.* 51, 251–261.
- Kotch, L.E., Iyer, N.V., Laughner, E., Semenza, G.L., 1999. Defective vascularization of HIF-1 α -null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev. Biol.* 209, 254–267.
- Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Skarlatos, J., Corti, L., Blandamura, S., Piazza, M., Gatter, K.C., Harris, A.L., 2001. Hypoxia inducible factor (HIF-1 α and HIF-2 α) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res.* 61, 1830–1832.
- Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R.A.M., Bedogni, F., Hodge, R., Attardo, A., Bell, C., Huttner, W.B., Hevner, R.F., 2009. Intermediate Neuronal Progenitors (Basal Progenitors)

- Produce Pyramidal–Projection Neurons for All Layers of Cerebral Cortex. *Cereb. Cortex N. Y.* NY 19, 2439–2450.
- Kozak, K.R., Abbott, B., Hankinson, O., 1997. ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev. Biol.* 191, 297–305.
- Krebs, C., 1929, The effect of roentgen irradiation on the interrelation between malignant tumors and their hosts. *Acta Radiologica* (Suppl. VIII).
- Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A., 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149–184.
- Kriegstein, A., Noctor, S., Martínez-Cerdeño, V., 2006. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nature Reviews Neuroscience* 7, 883–890.
- Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P., Semenza, G.L., 2003. Regulation of Colon Carcinoma Cell Invasion by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cancer Res* 63, 1138–1143.
- Krishnamachary, B., Zagzag, D., Nagasawa, H., Rainey, K., Okuyama, H., Baek, J.H., Semenza, G.L., 2006. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer Res.* 66, 2725–2731.
- Kudová, J., Procházková, J., Vašiček, O., Perečko, T., Sedláčková, M., Pešl, M., Pacherník, J., Kubala, L., 2016. HIF-1 α Deficiency Attenuates the Cardiomyogenesis of Mouse Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* 11, e0158358.
- Kugler, P., Schleyer, V., 2004. Developmental expression of glutamate transporters and glutamate dehydrogenase in astrocytes of the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 14, 975–985.
- Kumar, H., Choi, D.-K., 2015. Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? *Mediators Inflamm.* 2015, 584758.
- Kuo, Y.-C., Wu, H.-T., Hung, J.-J., Chou, T.-Y., Teng, S.-C., Wu, K.-J., 2015. Nijmegen breakage syndrome protein 1 (NBS1) modulates hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) stability and promotes in vitro migration and invasion under ionizing radiation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 64, 229–238.
- Lagadec, C., Vlashi, E., Della Donna, L., Dekmezian, C., Pajonk, F., 2012. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 833–844.
- LaMonica, B.E., Lui, J.H., Hansen, D.V., Kriegstein, A.R., 2013. Mitotic spindle orientation predicts outer radial glial cell generation in human neocortex. *Nat. Commun.* 4, 1665.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., Bruick, R.K., 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 16, 1466–1471.
- Lange, C., Calegari, F., 2010. Cdks and cyclins link G1 length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 9, 1893–1900.
- Lange, C., Huttner, W.B., Calegari, F., 2009. Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell* 5, 320–331.
- Lange, C., Turrero Garcia, M., Decimo, I., Bifari, F., Eelen, G., Quaegebeur, A., Boon, R., Zhao, H., Boeckx, B., Chang, J., Wu, C., Le Noble, F., Lambrechts, D., Dewerchin, M., Kuo, C.J., Huttner, W.B., Carmeliet, P., 2016. Relief of hypoxia by angiogenesis promotes neural stem cell differentiation by targeting glycolysis. *EMBO J.* 35, 924–941.
- Lathia, J.D., Heddleston, J.M., Venere, M., Rich, J.N., 2011. Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell Stem Cell* 8, 482–485.

- Lathia, J.D., Mack, S.C., Mulkearns-Hubert, E.E., Valentim, C.L.L., Rich, J.N., 2015. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* 29, 1203–1217.
- Lavdas, A.A., Grigoriou, M., Pachnis, V., Parnavelas, J.G., 1999. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 7881–7888.
- Lee, A., Pow, D.V., 2010. Astrocytes: Glutamate transport and alternate splicing of transporters. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1901–1906.
- Lee, C., Kim, S.J., Jeong, D.G., Lee, S.M., Ryu, S.E., 2003. Structure of Human FIH-1 Reveals a Unique Active Site Pocket and Interaction Sites for HIF-1 and von Hippel-Lindau. *J. Biol. Chem.* 278, 7558–7563.
- Lee, K., Qian, D.Z., Rey, S., Wei, H., Liu, J.O., Semenza, G.L., 2009a. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 2353–2358.
- Lee, K., Zhang, H., Qian, D.Z., Rey, S., Liu, J.O., Semenza, G.L., 2009b. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 17910–17915.
- Lee, P.J., Jiang, B.-H., Chin, B.Y., Iyer, N.V., Alam, J., Semenza, G.L., Choi, A.M.K., 1997. Hypoxia-inducible Factor-1 Mediates Transcriptional Activation of the Heme Oxygenase-1 Gene in Response to Hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 5375–5381.
- Lee, S.M., Tole, S., Grove, E., McMahon, A.P., 2000. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Dev. Camb. Engl.* 127, 457–467.
- Lee, S.-W., Jeong, H.-K., Lee, J.-Y., Yang, J., Lee, E.J., Kim, S.-Y., Youn, S.-W., Lee, J., Kim, W.J., Kim, K.-W., Lim, J.M., Park, J.-W., Park, Y.-B., Kim, H.-S., 2012. Hypoxic priming of mESCs accelerates vascular-lineage differentiation through HIF1-mediated inverse regulation of Oct4 and VEGF. *EMBO Mol Med* 4, 924–938.
- Lee, Y., Kim, K.H., Kim, D.G., Cho, H.J., Kim, Y., Rhee, J., Shin, K., Seo, Y.J., Choi, Y.-S., Lee, J.-I., Lee, J., Joo, K.M., Nam, D.-H., 2015. FoxM1 Promotes Stemness and Radio-Resistance of Glioblastoma by Regulating the Master Stem Cell Regulator Sox2. *PloS One* 10, e0137703.
- Lee, Y.M., Jeong, C.H., Koo, S.Y., Son, M.J., Song, H.S., Bae, S.K., Raleigh, J.A., Chung, H.Y., Yoo, M.A., Kim, K.W., 2001. Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Dev. Dyn.* 220, 175–186.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., McKay, R.D.G., 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585–595.
- Leszczyniecka, M., Roberts, T., Dent, P., Grant, S., Fisher, P.B., 2001. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol. Ther.* 90, 105–156.
- Letinic, K., Zoncu, R., Rakic, P., 2002. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 417, 645–649.
- Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S., Goldberg, M.A., 1995. Transcriptional Regulation of the Rat Vascular Endothelial Growth Factor Gene by Hypoxia. *J. Biol. Chem.* 270, 13333–13340.
- Li, F., Chen, X., Xu, B., Zhou, H., 2015. Curcumin induces p53-independent necrosis in H1299 cells via a mitochondria-associated pathway. *Mol. Med. Rep.* 12, 7806–7814.
- Li, H., Ko, H.P., Whitlock, J.P., 1996. Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J. Biol. Chem.* 271, 21262–21267.
- Li, L., Candelario, K.M., Thomas, K., Wang, R., Wright, K., Messier, A., Cunningham, L.A., 2014. Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) Is Required for Neural Stem Cell Maintenance and Vascular Stability in the Adult Mouse SVZ. *J. Neurosci.* 34, 16713–16719.

- Li, Q.F., Wang, X.R., Yang, Y.W., Lin, H., 2006. Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3 α expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1 α . *Cell Res.* 16, 548–558.
- Li, S.H., Shin, D.H., Chun, Y.-S., Lee, M.K., Kim, M.-S., Park, J.-W., 2008. A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1{ α }. *Mol. Cancer Ther.* 7, 3729–3738.
- Li, X., Ishihara, S., Yasuda, M., Nishioka, T., Mizutani, T., Ishikawa, M., Kawabata, K., Shirato, H., Haga, H., 2013. Lung cancer cells that survive ionizing radiation show increased integrin α 2 β 1- and EGFR-dependent invasiveness. *PloS One* 8, e70905.
- Li, Y., Li, A., Glas, M., Lal, B., Ying, M., Sang, Y., Xia, S., Trageser, D., Guerrero-Cázares, H., Eberhart, C.G., Quiñones-Hinojosa, A., Scheffler, B., Lattera, J., 2011. c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 9951–9956.
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., Rich, J.N., 2009. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 15, 501–513.
- Liapi, A., Pritchett, J., Jones, O., Fujii, N., Parnavelas, J.G., Nadarajah, B., 2008. Stromal-derived factor 1 signalling regulates radial and tangential migration in the developing cerebral cortex. *Dev. Neurosci.* 30, 117–131.
- Lieb, M.E., Menzies, K., Moschella, M.C., Ni, R., Taubman, M.B., 2002. Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 80, 421–426.
- Liem, K.F., Tremml, G., Roelink, H., Jessell, T.M., 1995. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82, 969–979.
- Liu, L., Marti, G.P., Wei, X., Zhang, X., Zhang, H., Liu, Y.V., Nastai, M., Semenza, G.L., Harmon, J.W., 2008. Age-dependent impairment of HIF-1 α expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells. *J. Cell. Physiol.* 217, 319–327.
- Liu, Y.V., Baek, J.H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R.N., Semenza, G.L., 2007. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 α and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 α . *Mol. Cell* 25, 207–217.
- Liu, Y.V., Semenza, G.L., 2007. RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 α degradation vs. stabilization. *Cell Cycle* 6, 656–659.
- Liu, Z., Zhang, Z., Lindtner, S., Li, Z., Xu, Z., Wei, S., Liang, Q., Wen, Y., Tao, G., You, Y., Chen, B., Wang, Y., Rubenstein, J.L., Yang, Z., 2018. Sp9 Regulates Medial Ganglionic Eminence-Derived Cortical Interneuron Development. *Cereb. Cortex.*
- Lizarraga, S.B., Margossian, S.P., Harris, M.H., Campagna, D.R., Han, A.-P., Blevins, S., Mudbhary, R., Barker, J.E., Walsh, C.A., Fleming, M.D., 2010. Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. *Dev. Camb. Engl.* 137, 1907–1917.
- Lopez-Novoa, J., Nieto, M., 2009. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med* 1(6-7): 303-314.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P., 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 97–109.
- Mace, K.A., Yu, D.H., Paydar, K.Z., Boudreau, N., Young, D.M., 2007. Sustained expression of Hif-1 α in the diabetic environment promotes angiogenesis and cutaneous wound repair. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 15, 636–645.

- Machon, O., Backman, M., Machonova, O., Kozmik, Z., Vacik, T., Andersen, L., Krauss, S., 2007. A dynamic gradient of Wnt signaling controls initiation of neurogenesis in the mammalian cortex and cellular specification in the hippocampus. *Dev. Biol.* 311, 223–237.
- Madani, I., De Neve, W., Mareel, M., 2008. Madani I, De Neve W, Mareel M Does ionizing radiation stimulate cancer invasion and metastasis? *Bull Cancer* 95: 292-300.
- Mahabir, R., Tanino, M., Elmansuri, A., Wang, L., Kimura, T., Itoh, T., Ohba, Y., Nishihara, H., Shirato, H., Tsuda, M., Tanaka, S., 2014. Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. *Neuro-Oncol.* 16, 671–685.
- Majmundar, A.J., Wong, W.J., Simon, M.C., 2010. Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Molecular Cell* 40, 294–309.
- Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W.J., Tanaka, H., Poellinger, L., 2002. Inhibitory PAS Domain Protein (IPAS) Is a Hypoxia-inducible Splicing Variant of the Hypoxia-inducible Factor-3 α Locus. *J. Biol. Chem.* 277, 32405–32408.
- Malatesta, P., Hartfuss, E., Götz, M., 2000. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neural lineage. *Development, Development (Cambridge), Development (Cambridge, England)* 127, 5253–5263.
- Maltepe, E., Keith, B., Arsham, A.M., Brorson, J.R., Simon, M.C., 2000. The Role of ARNT2 in Tumor Angiogenesis and the Neural Response to Hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 231–238.
- Manalo, D.J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B.D., Ye, S.Q., Garcia, J.G.N., Semenza, G.L., 2005. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105, 659–669.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., Weinberg, R.A., 2008. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 133, 704–715.
- Manuel, M., Price, D.J., 2005. Role of Pax6 in forebrain regionalization. *Brain Res. Bull.* 66, 387–393.
- Marampon, F., Gravina, G.L., Zani, B.M., Popov, V.M., Fratticci, A., Cerasani, M., Di Genova, D., Mancini, M., Ciccarelli, C., Ficorella, C., Di Cesare, E., Festuccia, C., 2014. Hypoxia sustains glioblastoma radioresistance through ERKs/DNA-PKcs/HIF-1 α functional interplay. *Int. J. Oncol.* 44, 2121–2131.
- Mareel, M., Oliveira, M.J., Madani, I., 2009. Cancer invasion and metastasis: interacting ecosystems. *Virchows Arch.* 454, 599.
- Marin-Padilla, M., 1978. Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat. Embryol. (Berl.)* 152, 109–126.
- Marthiens, V., French-Constant, C., 2009. Adherens junction domains are split by asymmetric division of embryonic neural stem cells. *EMBO reports* 10, 515–520.
- Martinez Cerdeno, V., Noctor, S., Kriegstein, A., 2006. The Role of Intermediate Progenitor Cells in the Evolutionary Expansion of the Cerebral Cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 16 Suppl 1, i152-61.
- Martínez-Martínez, M.Á., Romero, C.D.J., Fernández, V., Cárdenas, A., Götz, M., Borrell, V., 2016. A restricted period for formation of outer subventricular zone defined by Cdh1 and Trnp1 levels. *Nature Communications* 7, 11812.
- Martynoga, B., Drechsel, D., Guillemot, F., 2012. Molecular Control of Neurogenesis: A View from the Mammalian Cerebral Cortex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a008359.
- Masoud, G.N., Li, W., 2015. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 5, 378–389.

- Masson, N., Ratcliffe, P.J., 2003. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels. *Journal of Cell Science* 116, 3041–3049.
- Masson, N., Willam, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., 2001. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *The EMBO Journal* 20, 5197–5206.
- Matsuzaki, F., Shitamukai, A., 2015. Cell Division Modes and Cleavage Planes of Neural Progenitors during Mammalian Cortical Development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a015719.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., Ratcliffe, P.J., 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *NATURE* 399, 271–275.
- Maynard, M.A., Qi, H., Chung, J., Lee, E.H.L., Kondo, Y., Hara, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Ohh, M., 2003a. Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J. Biol. Chem.* 278, 11032–11040.
- Mazumdar, J., O'Brien, W.T., Johnson, R.S., LaManna, J.C., Chavez, J.C., Klein, P.S., Simon, M.C., 2010. O₂ regulates stem cells through Wnt/ β -catenin signalling. *Nat. Cell Biol.* 12, 1007–1013.
- Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M.C., Berta, M.A., Benizri, E., Bilton, R.L., Dayan, F., Ginouvès, A., Berra, E., Pouyssegur, J., 2004. HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochem. Pharmacol.* 68, 971–980.
- Mazure, N.M., Chauvet, C., Bois-Joyeux, B., Bernard, M.-A., Nacer-Chérif, H., Danan, J.-L., 2002. Repression of α -Fetoprotein Gene Expression under Hypoxic Conditions in Human Hepatoma Cells: Characterization of a Negative Hypoxia Response Element That Mediates Opposite Effects of Hypoxia Inducible Factor-1 and c-Myc. *Cancer Res.* 62, 1158–1165.
- Mazzone, M., Dettori, D., Oliveira, R.L. de, Loges, S., Schmidt, T., Jonckx, B., Tian, Y.-M., Lanahan, A.A., Pollard, P., Almodovar, C.R. de, Smet, F.D., Vinckier, S., Aragonés, J., Debackere, K., Luttun, A., Wyns, S., Jordan, B., Pisacane, A., Gallez, B., Lampugnani, M.G., Dejana, E., Simons, M., Ratcliffe, P., Maxwell, P., Carmeliet, P., 2009. Heterozygous Deficiency of PHD2 Restores Tumor Oxygenation and Inhibits Metastasis via Endothelial Normalization. *Cell* 136, 839–851.
- McClintock, D.S., Santore, M.T., Lee, V.Y., Brunelle, J., Budinger, G.R.S., Zong, W.-X., Thompson, C.B., Hay, N., Chandel, N.S., 2002. Bcl-2 Family Members and Functional Electron Transport Chain Regulate Oxygen Deprivation-Induced Cell Death.
- McCord, A.M., Jamal, M., Shankavarum, U.T., Lang, F.F., Camphausen, K., Tofilon, P.J., 2009. Physiologic Oxygen Concentration Enhances the Stem-Like Properties of CD133+ Human Glioblastoma Cells In vitro. *Mol Cancer Res* 7, 489–497.
- McKay, R., 1997. Stem cells in the central nervous system. *Science* 276, 66–71.
- McKenna, W.L., Betancourt, J., Larkin, K.A., Abrams, B., Guo, C., Rubenstein, J.L.R., Chen, B., 2011. Tbr1 and Fezf2 Regulate Alternate Corticofugal Neuronal Identities during Neocortical Development. *J. Neurosci.* 31, 549–564.
- McMahon, J.J., Shi, L., Silver, D.L., 2014. Generation of a Magoh conditional allele in mice. *genesis* 52, 752–758.
- McNEILL, L.A., Hewitson, K.S., Claridge, T.D., Seibel, J.F., Horsfall, L.E., Schofield, C.J., 2002. Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the β -carbon of asparagine-803. *Biochemical Journal* 367, 571–575.
- Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L.S., Cox, G.W., Varesio, L., 1995. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *Journal of Experimental Medicine* 182, 1683–1693.

- Méndez, O., Zavadil, J., Esencay, M., Lukyanov, Y., Santovasi, D., Wang, S.-C., Newcomb, E.W., Zagzag, D., 2010. Knock down of HIF-1 α in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres. *Mol. Cancer* 9, 133.
- Merighi, S., Benini, A., Mirandola, P., Gessi, S., Varani, K., Leung, E., MacLennan, S., Borea, P.A., 2006. Adenosine modulates vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1 in human glioblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 72, 19–31.
- Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J.H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W.Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Bürgel, T., Jelkmann, W., Acker, H., Fandrey, J., 2003. Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *Journal of Cell Science* 116, 1319–1326.
- Michalczyk, K., Ziman, M., 2005. Nestin Structure and Predicted Function in Cellular Cytoskeletal Organisation.
- Mihalas, A.B., Hevner, R.F., 2017. Chapter Ten - Control of Neuronal Development by T-Box Genes in the Brain, in: Frasn, M. (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology, T-Box Genes in Development and Disease*. Academic Press, pp. 279–312.
- Milosevic, J., Maisel, M., Wegner, F., Leuchtenberger, J., Wenger, R.H., Gerlach, M., Storch, A., Schwarz, J., 2007. Lack of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Impairs Midbrain Neural Precursor Cells Involving Vascular Endothelial Growth Factor Signaling. *J. Neurosci.* 27, 412–421.
- Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Raes, M., Michiels, C., 2001. Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 847–855.
- Minet, E., Mottet, D., Michel, G., Roland, I., Raes, M., Remacle, J., Michiels, C., 1999. Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 α -Hsp90 interaction. *FEBS Letters* 460, 251–256.
- Mischel, P.S., Nelson, S.F., Cloughesy, T.F., 2003. Molecular Analysis of Glioblastoma: Pathway Profiling and Its Implications for Patient Therapy. *Cancer Biol. Ther.* 2, 242–247.
- Mischel, P.S., Nelson, S.F., Cloughesy, T.F., 2003. Molecular Analysis of Glioblastoma: Pathway Profiling and Its Implications for Patient Therapy. *Cancer Biology & Therapy* 2, 242–247.
- Miyama, S., Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., 1997. A gradient in the duration of the G1 phase in the murine neocortical proliferative epithelium. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 7, 678–689.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., Ogawa, M., 2004. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development (Cambridge, England)* 131, 3133–45.
- Miyata, T., Okamoto, M., Shinoda, T., Kawaguchi, A., 2015. Interkinetic nuclear migration generates and opposes ventricular-zone crowding: insight into tissue mechanics. *Front Cell Neurosci* 8.
- Moeller, B.J., Dewhirst, M.W., 2004. Raising the Bar: How HIF-1 Helps Determine Tumor Radiosensitivity. *Cell Cycle* 3, 1105–1108.
- Moeller, B.J., Dreher, M.R., Rabbani, Z.N., Schroeder, T., Cao, Y., Li, C.Y., Dewhirst, M.W., 2005. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell* 8, 99–110.
- Moeller, B.J., Richardson, R.A., Dewhirst, M.W., 2007. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 241–248.
- Moeller, Benjamin J., Cao, Y., Li, C.Y., Dewhirst, M.W., 2004. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 5, 429–441.
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., Quiñones-Hinojosa, A., 2010. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7, 150–161.
- Mole, D.R., Blancher, C., Copley, R.R., Pollard, P.J., Gleadle, J.M., Ragoussis, J., Ratcliffe, P.J., 2009. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA

- binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J. Biol. Chem.* 284, 16767–16775.
- Molineaux, S.M., 2012. Molecular pathways: targeting proteasomal protein degradation in cancer. *Clin. Cancer Res.* 18, 15–20.
- Moncharmont, C., Levy, A., Guy, J.-B., Falk, A.T., Guilbert, M., Trone, J.-C., Alphonse, G., Gilormini, M., Ardail, D., Toillon, R.-A., Rodriguez-Lafrasse, C., Magné, N., 2014. Radiation-enhanced cell migration/invasion process: A review. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 92, 133–142.
- Monteiro, A.R., Hill, R., Pilkington, G.J., Madureira, P.A., 2017. The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *Cells* 6, 45.
- Mora-Bermúdez, F., Matsuzaki, F., Huttner, W.B., 2014. Specific polar subpopulations of astral microtubules control spindle orientation and symmetric neural stem cell division. *eLife* 3.
- Moreno-Manzano, V., Rodríguez-Jiménez, F.J., Aceña-Bonilla, J.L., Fustero-Lardies, S., Erceg, S., Dopazo, J., Montaner, D., Stojkovic, M., Sánchez-Puelles, J.M., 2010. FM19G11, a New Hypoxia-inducible Factor (HIF) Modulator, Affects Stem Cell Differentiation Status. *J. Biol. Chem.* 285, 1333–1342.
- Morfoisse, F., Kuchnio, A., Frainay, C., Gomez-Brouchet, A., Delisle, M.-B., Marzi, S., Helfer, A.-C., Hantelys, F., Pujol, F., Guillermet-Guibert, J., Bousquet, C., Dewerchin, M., Pyronnet, S., Prats, A.-C., Carmeliet, P., Garmy-Susini, B., 2014. Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1 α -independent translation-mediated mechanism. *Cell Rep.* 6, 155–167.
- Mori, T., Buffo, A., Götz, M., 2005. The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 69, 67–99.
- Morrison, S.J., Csete, M., Groves, A.K., Melega, W., Wold, B., Anderson, D.J., 2000. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 7370–7376.
- Morriss, G.M., New, D.A., 1979. Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos. *J. Embryol Exp Morphol* 54, 17–35.
- Movafagh, S., Crook, S., Vo, K., 2015. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J. Cell. Biochem.* 116, 696–703.
- Mukherjee, D., Coates, P.J., Lorimore, S.A., Wright, E.G., n.d. Responses to ionizing radiation mediated by inflammatory mechanisms. *The Journal of Pathology* 232, 289–299.
- Mukhopadhyay, C.K., Mazumder, B., Fox, P.L., 2000. Role of Hypoxia-inducible Factor-1 in Transcriptional Activation of Ceruloplasmin by Iron Deficiency. *J. Biol. Chem.* 275, 21048–21054.
- Mutch, C.A., Schulte, J.D., Olson, E., Chenn, A., 2010. Beta-Catenin Signaling Negatively Regulates Intermediate Progenitor Population Numbers in the Developing Cortex. *PLOS ONE* 5, e12376.
- Nakada, M., Okada, Y., Yamashita, J., 2003. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Front. Biosci.*
- Nalla, A.K., Asuthkar, S., Bhoopathi, P., Gujrati, M., Dinh, D.H., Rao, J.S., 2010. Suppression of uPAR Retards Radiation-Induced Invasion and Migration Mediated by Integrin β 1/FAK Signaling in Medulloblastoma. *PLOS ONE* 5, e13006.
- Nam, J.-S., Ino, Y., Kanai, Y., Sakamoto, M., Hirohashi, S., 2004. 5-aza-2'-deoxycytidine restores the E-cadherin system in E-cadherin-silenced cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 21, 49–56.
- Nambu, J.R., Lewis, J.O., Wharton, K.A., Crews, S.T., 1991. The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67, 1157–1167.

- Narravula, S., Colgan, S.P., 2001. Hypoxia-Inducible Factor 1-Mediated Inhibition of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Expression During Hypoxia. *J. Immunol.* 166, 7543–7548.
- Nelson, B.R., Hodge, R.D., Bedogni, F., Hevner, R.F., 2013. Dynamic Interactions between Intermediate Neurogenic Progenitors and Radial Glia in Embryonic Mouse Neocortex: Potential Role in Dll1-Notch Signaling. *J. Neurosci.* 33, 9122–9139.
- Nery, S., Fishell, G., Corbin, J.G., 2002. The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat. Neurosci.* 5, 1279–1287.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z., 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal* 13, 9–22.
- Newton, H.B., 2004. Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 2: PI3K/Akt/PTEN, mTOR, SHH/PTCH and angiogenesis. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 4, 105–128.
- Nguyen, S.V., Claycomb, W.C., 1999. Hypoxia Regulates the Expression of the Adrenomedullin and HIF-1 Genes in Cultured HL-1 Cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265, 382–386.
- Nieminen, A.-L., Qanungo, S., Schneider, E.A., Jiang, B.-H., Agani, F.H., 2005. Mdm2 and HIF-1 α interaction in tumor cells during hypoxia. *J. Cell. Physiol.* 204, 364–369.
- Nishina, S., Kohsaka, S., Yamaguchi, Y., Handa, H., Kawakami, A., Fujisawa, H., Azuma, N., 1999. PAX6 expression in the developing human eye. *Br. J. Ophthalmol.* 83, 723–727.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., Kriegstein, A.R., 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7, 136–144.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Kriegstein, A.R., 2007. Neural stem and progenitor cells in cortical development. *Novartis Found. Symp.* 288, 59–73; discussion 73–78, 96–98.
- NOCTOR, S.C., MARTÍNEZ-CERDEÑO, V., KRIEGSTEIN, A.R., 2008. Distinct Behaviors of Neural Stem and Progenitor Cells Underlie Cortical Neurogenesis. *J Comp Neurol* 508, 28–44.
- Nonaka-Kinoshita, M., Reillo, I., Artegiani, B., Martínez-Martínez, M.Á., Nelson, M., Borrell, V., Calegari, F., 2013. Regulation of cerebral cortex size and folding by expansion of basal progenitors. *EMBO J.* 32, 1817–1828.
- Nowak, F.V., Gore, A.C., 1999. Perinatal developmental changes in expression of the neuropeptide genes preoptic regulatory factor-1 and factor-2, neuropeptide Y and GnRH in rat hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 11, 951–958.
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2013. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 764–772.
- Ohtsuka, T., Shimojo, H., Matsunaga, M., Watanabe, N., Kometani, K., Minato, N., Kageyama, R., 2011. Gene expression profiling of neural stem cells and identification of regulators of neural differentiation during cortical development. *Stem Cells Dayt. Ohio* 29, 1817–1828.
- Oikawa, T., Yamada, T., 2003. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 303, 11–34.
- Orii, K.E., Lee, Y., Kondo, N., McKinnon, P.J., 2006. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *PNAS* 103, 10017–10022.
- Ortega, J.A., Sirois, C.L., Memi, F., Glidden, N., Zecevic, N., 2017. Oxygen Levels Regulate the Development of Human Cortical Radial Glia Cells. *Cereb. Cortex* 27, 3736–3751.
- Ostrem, B., Di Lullo, E., Kriegstein, A., 2017. oRGs and mitotic somal translocation — a role in development and disease. *Current Opinion in Neurobiology, Developmental neuroscience* 42, 61–67.

- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., 2015. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncol.* 17, iv1–iv62.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., Wolinsky, Y., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J., 2014. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-Oncol.* 16 Suppl 4, iv1-63.
- Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., Maekawa, M., 2008. Concise Review: Pax6 Transcription Factor Contributes to both Embryonic and Adult Neurogenesis as a Multifunctional Regulator. *STEM CELLS* 26, 1663–1672.
- Otomo, T., Hishii, M., Arai, H., Sato, K., Sasai, K., 2004. Microarray Analysis of Temporal Gene Responses to Ionizing Radiation in Two Glioblastoma Cell Lines: Up-regulation of DNA Repair Genes. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 45, 53–60.
- Pagès, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J.C., Meloche, S., Pouyssegur, J., 1993. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *PNAS* 90, 8319–8323.
- Pajonk Frank, Vlashi Erina, McBride William H., 2010. Radiation Resistance of Cancer Stem Cells: The 4 R's of Radiobiology Revisited. *STEM CELLS* 28, 639–648.
- Panchision, D.M., 2009. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J. Cell. Physiol.* 220, 562–568.
- Panchision, D.M., Pickel, J.M., Studer, L., Lee, S.H., Turner, P.A., Hazel, T.G., McKay, R.D., 2001. Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev.* 15, 2094–2110.
- Papi, A., Bartolini, G., Ammar, K., Guerra, F., Ferreri, A.M., Rocchi, P., Orlandi, M., 2007. Inhibitory effects of retinoic acid and IIF on growth, migration and invasiveness in the U87MG human glioblastoma cell line. *Oncol. Rep.* 18, 1015–1021.
- Pardee, A.B., 1989. G1 Events and Regulation of Cell Proliferation. *Science* 246, 603–608.
- Park, C.-M., Park, M.-J., Kwak, H.-J., Lee, H.-C., Kim, M.-S., Lee, S.-H., Park, I.-C., Rhee, C.H., Hong, S.-I., 2006. Ionizing Radiation Enhances Matrix Metalloproteinase-2 Secretion and Invasion of Glioma Cells through Src/Epidermal Growth Factor Receptor–Mediated p38/Akt and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathways. *Cancer Res* 66, 8511–8519
- Park, D., Xiang, A.P., Mao, F.F., Zhang, L., Di, C.-G., Liu, X.-M., Shao, Y., Ma, B.-F., Lee, J.-H., Ha, K.-S., Walton, N., Lahn, B.T., 2010. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 2162–2171. <https://doi.org/10.1002/stem.541>
- Park, H.J., Griffin, R.J., Hui, S., Levitt, S.H., Song, C.W., 2012. Radiation-Induced Vascular Damage in Tumors: Implications of Vascular Damage in Ablative Hypofractionated Radiotherapy (SBRT and SRS). *Radiation Research* 177, 311–327.
- Park, J.K., Jang, S.J., Kang, S.W., Park, S., Hwang, S.-G., Kim, W.-J., Kang, J.H., Um, H.-D., 2012. Establishment of animal model for the analysis of cancer cell metastasis during radiotherapy. *Radiat Oncol* 7, 153.
- Perazzoli, G., Prados, J., Ortiz, R., Caba, O., Cabeza, L., Berdasco, M., González, B., Melguizo, C., 2015. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. *PLOS ONE* 10, e0140131.
- Perazzoli, G., Prados, J., Ortiz, R., Caba, O., Cabeza, L., Berdasco, M., González, B., Melguizo, C., 2015. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. *PLOS ONE* 10, e0140131.
- Phi, L.T.H., Sari, I.N., Yang, Y.-G., Lee, S.-H., Jun, N., Kim, K.S., Lee, Y.K., Kwon, H.Y., 2018. Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells International* 2018.

- Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., Williams, P.M., Modrusan, Z., Feuerstein, B.G., Aldape, K., 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157–173.
- Piao, L.S., Hur, W., Kim, T.-K., Hong, S.W., Kim, S.W., Choi, J.E., Sung, P.S., Song, M.J., Lee, B.-C., Hwang, D., Yoon, S.K., 2012. CD133+ liver cancer stem cells modulate radioresistance in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 315, 129–137.
- Pietras, A., Johnsson, A.S., Pålman, S., 2010. The HIF-2 α -driven pseudo-hypoxic phenotype in tumor aggressiveness, differentiation, and vascularization. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 345, 1–20.
- Pilaz, L.-J., McMahon, J.J., Miller, E.E., Lennox, A.L., Suzuki, A., Salmon, E., Silver, D.L., 2016. Prolonged Mitosis of Neural Progenitors Alters Cell Fate in the Developing Brain. *Neuron* 89, 83–99.
- Pilaz, L.-J., Patti, D., Marcy, G., Ollier, E., Pfister, S., Douglas, R.J., Betizeau, M., Gautier, E., Cortay, V., Doerflinger, N., Kennedy, H., Dehay, C., 2009. Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. *PNAS* 106, 21924–21929.
- Pineda, JR., Jeitany, M., Andrieux, A., Junier, MP., Chneiweiss, H., Boussin, F.D., 2017. Intranasal Administration of Temozolomide Delayed the Development of Brain Tumors Initiated by Human Glioma Stem-Like Cell in Nude Mice. *J. Cancer Sci. Ther.* 9, 374–378.
- Piret, J.-P., Mottet, D., Raes, M., Michiels, C., 2002. Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem. Pharmacol., Cell Signaling, Transcription and Translation as Therapeutic Targets* 64, 889–892.
- Pistollato, F., Chen, H.-L., Schwartz, P.H., Basso, G., Panchision, D.M., 2007. Oxygen tension controls the expansion of human CNS precursors and the generation of astrocytes and oligodendrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 424–435.
- Plachez, C., Danbolt, N.C., Récasens, M., 2000. Transient expression of the glial glutamate transporters GLAST and GLT in hippocampal neurons in primary culture. *J. Neurosci. Res.* 59, 587–593.
- Pollenz, R.S., Sattler, C.A., Poland, A., 1994. The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol* 45, 428–438.
- Porteus, M.H., Brice, A.E.J., Bulfone, A., Usdin, T.B., Ciaranello, R.D., Rubenstein, J.L.R., 1992. Isolation and characterization of a library of cDNA clones that are preferentially expressed in the embryonic telencephalon. *Mol. Brain Res.* 12, 7–22.
- Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M., Ratcliffe, P.J., 1997. Activation of Hypoxia-inducible Factor-1; Definition of Regulatory Domains within the α Subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 11205–11214.
- Pulvers, J.N., Huttner, W.B., 2009. Brca1 is required for embryonic development of the mouse cerebral cortex to normal size by preventing apoptosis of early neural progenitors. *Development* 136, 1859–1868.
- Qiang, L., Wu, T., Zhang, H.-W., Lu, N., Hu, R., Wang, Y.-J., Zhao, L., Chen, F.-H., Wang, X.-T., You, Q.-D., Guo, Q.-L., 2012. HIF-1 α is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway. *Cell Death Differ.* 19, 284–294.
- Qiu, B., Zhang, D., Tao, J., Tie, X., Wu, A., Yunjie, W., 2011. Human brain glioma stem cells are more invasive than their differentiated progeny cells in vitro. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 19, 130–4.
- Quinn, J.C., Molinek, M., Martynoga, B.S., Zaki, P.A., Faedo, A., Bulfone, A., Hevner, R.F., West, J.D., Price, D.J., 2007. Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the

- cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism. *Dev. Biol.* 302, 50–65.
- Raab, S., Beck, H., Gaumann, A., Yüce, A., Gerber, H.-P., Plate, K., Hammes, H.-P., Ferrara, N., Breier, G., 2004. Impaired brain angiogenesis and neuronal apoptosis induced by conditional homozygous inactivation of vascular endothelial growth factor. *Thromb. Haemost.* 91, 595–605.
- Rakic, P., 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *Journal of Comparative Neurology* 145, 61–83.
- Rakic, P., 1988. Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241, 170–176.
- Rakic, P., Hashimoto-Torii, K., Sarkisian, M.R., 2007. Genetic determinants of neuronal migration in the cerebral cortex. *Novartis Found. Symp.* 288, 45–53; discussion 53-58, 96–98.
- Ramasamy, S.K., Kusumbe, A.P., Adams, R.H., 2015. Regulation of tissue morphogenesis by endothelial cell-derived signals. *Trends Cell Biol.* 25, 148–157.
- Rampling, R., Cruickshank, G., Lewis, A.D., Fitzsimmons, S.A., Workman, P., 1994. Direct measurement of pO₂ distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors. *Int. J. Radiat. Oncol., The Eighth International Conference on Chemical Modifiers of Cancer Treatment Part 2* 29, 427–431.
- Rankin, E.B., Giaccia, A.J., 2008. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 15, 678–685.
- Rankin, E.B., Giaccia, A.J., 2016. Hypoxic control of metastasis. *Science* 352, 175–180.
- Rao, R.D., Uhm, J.H., Krishnan, S., James, C.D., 2003. Genetic and signaling pathway alterations in glioblastoma: relevance to novel targeted therapies. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 8, e270-280.
- Ravenna, L., Salvatori, L., Russo, M.A., 2016. HIF3 α : the little we know. *FEBS J.* 283, 993–1003.
- Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z.M., Sutter, C.H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L.E., Madan, A., Semenza, G.L., Bedi, A., 2000. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 14, 34–44.
- Reillo, I., de Juan Romero, C., García-Cabezas, M.Á., Borrell, V., 2011. A Role for Intermediate Radial Glia in the Tangential Expansion of the Mammalian Cerebral Cortex. *Cereb Cortex* 21, 1674–1694.
- Ren, J.Q., Aika, Y., Heizmann, C.W., Kosaka, T., 1992. Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons. *Exp. Brain Res.* 92, 1–14.
- Rey, S., Semenza, G.L., 2010. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc. Res.* 86, 236–242.
- Richard, D.E., Berra, E., Gothié, E., Roux, D., Pouyssegur, J., 1999. p42/p44 Mitogen-activated Protein Kinases Phosphorylate Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and Enhance the Transcriptional Activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* 274, 32631–32637.
- Rieken, S., Habermehl, D., Mohr, A., Wuerth, L., Lindel, K., Weber, K., Debus, J., Combs, S.E., 2011. Targeting $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ inhibits photon-induced hypermigration of malignant glioma cells. *Radiation Oncology* 6, 132.
- Rieken, S., Habermehl, D., Wuerth, L., Brons, S., Mohr, A., Lindel, K., Weber, K., Haberer, T., Debus, J., Combs, S.E., 2012. Carbon Ion Irradiation Inhibits Glioma Cell Migration Through Downregulation of Integrin Expression. *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics* 83, 394–399.
- Rofstad, E.K., Mathiesen, B., Galappathi, K., 2004. Increased metastatic dissemination in human melanoma xenografts after subcurative radiation treatment: radiation-induced increase in fraction of hypoxic cells and hypoxia-induced up-regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Cancer Res.* 64, 13–18.

- Roitbak, T., Li, L., Cunningham, L.A., 2008. Neural Stem/Progenitor Cells Promote Endothelial Cell Morphogenesis and Protect Endothelial Cells against Ischemia via HIF-1 α -regulated VEGF Signaling. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1530–1542.
- Roitbak, T., Surviladze, Z., Cunningham, L.A., 2011. Continuous Expression of HIF-1 α in Neural Stem/Progenitor Cells. *Cell Mol Neurobiol* 31, 119–133.
- Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M., Wenger, R.H., 1997. Oxygen-regulated Transferrin Expression Is Mediated by Hypoxia-inducible Factor-1. *J. Biol. Chem.* 272, 20055–20062.
- Rong, Y., Durden, D.L., Meir, V., G, E., Brat, D.J., 2006. ‘Pseudopalisading’ Necrosis in Glioblastoma: A Familiar Morphologic Feature That Links Vascular Pathology, Hypoxia, and Angiogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 529–539.
- Roque, T., Haton, C., Etienne, O., Chicheportiche, A., Rousseau, L., Martin, L., Mouthon, M.-A., Boussin, F.D., 2012. Lack of a p21waf1/cip -dependent G1/S checkpoint in neural stem and progenitor cells after DNA damage in vivo. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 537–547.
- Ross, S.E., Greenberg, M.E., Stiles, C.D., 2003. Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 39, 13–25.
- Ruas, J.L., Poellinger, L., Pereira, T., 2002. Functional Analysis of Hypoxia-inducible Factor-1 α -mediated Transactivation identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *Biol. Chem.* 277, 38723–38730.
- Ruas, J.L., Poellinger, L., Pereira, T., 2005. Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *J. Cell Sci.* 118, 301–311.
- Rushing, G., Ihrie, R.A., 2016. Neural stem cell heterogeneity through time and space in the ventricular-subventricular zone. *Front Biol (Beijing)* 11, 261–284.
- Russ, A.P., Wattler, S., Colledge, W.H., Aparicio, S.A., Carlton, M.B., Pearce, J.J., Barton, S.C., Surani, M.A., Ryan, K., Nehls, M.C., Wilson, V., Evans, M.J., 2000. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* 404, 95–9.
- Ryan, Heather E., Lo, J., Johnson, R.S., 1998. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *The EMBO Journal* 17, 3005–3015.
- Salceda, S., Caro, J., 1997. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272, 22642–22647.
- Sang, N., Stiehl, D.P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V., Caro, J., 2003. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J. Biol. Chem.* 278, 14013–14019.
- Santilli, G., Lamorte, G., Carlessi, L., Ferrari, D., Nodari, L.R., Binda, E., Delia, D., Vescovi, A.L., Filippis, L.D., 2010. Mild Hypoxia Enhances Proliferation and Multipotency of Human Neural Stem Cells. *PLOS ONE* 5, e8575.
- Santore, M.T., McClintock, D.S., Lee, V.Y., Budinger, G.R.S., Chandel, N.S., 2002. Anoxia-induced apoptosis occurs through a mitochondria-dependent pathway in lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 282, L727-734
- Scardigli, R., Bäumer, N., Gruss, P., Guillemot, F., Roux, I.L., 2003. Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene Neurogenin2 by Pax6. *Development* 130, 3269–3281.
- Schaich, M., Kestel, L., Pfirrmann, M., Robel, K., Illmer, T., Kramer, M., Dill, C., Ehninger, G., Schackert, G., Krex, D., 2009. A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. *Ann. Oncol.* 20, 175–181.
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462.

- Schipani, E., Ryan, H.E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., Johnson, R.S., 2001. Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.* 15, 2865–2876.
- Schmid, T., Zhou, J., Köhl, R., Brüne, B., 2004. p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Biochem. J.* 380, 289–295.
- Schmidt, T.I., Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Lavoie, S.B., Stierhof, Y.-D., Nigg, E.A., 2009. Control of centriole length by CPAP and CP110. *Curr. Biol.* CB 19, 1005–1011.
- Schneider, C., Krischke, G., Rascher, W., Gassmann, M., Trollmann, R., 2012. Systemic hypoxia differentially affects neurogenesis during early mouse brain maturation. *Brain Dev.* 34, 261–273.
- Schneider, T., Mawrin, C., Scherlach, C., Skalej, M., Firsching, R., 2010. Gliomas in adults. *Dtsch. Arzteblatt Int.* 107, 799–807; quiz 808.
- Schuler, M., Green, D.R., 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 684–688.
- Scully, R., Chen, J., Ochs, R.L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J., Livingston, D.M., 1997. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 90, 425–435.
- Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G., Bonner, W.M., 2002. Quantitative Detection of 125IdU-Induced DNA Double-Strand Breaks with γ -H2AX Antibody. *Radiat. Res.* 158, 486–492.
- Seeger, R., Krebs, E.G., 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9, 726–735.
- Seidel, S., Garvalov, B.K., Wirta, V., von Stechow, L., Schänzer, A., Meletis, K., Wolter, M., Sommerlad, D., Henze, A.-T., Nistér, M., Reifenberger, G., Lundeberg, J., Frisén, J., Acker, T., 2010. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 α . *Brain* 133, 983–995.
- Sell, S., 2004. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 51, 1–28.
- Semenza, G., 2002. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* 64, 993–998.
- Semenza, G.L., 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 588–594.
- Semenza, G.L., 1999. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 551–578.
- Semenza, G.L., 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 3, 721–732.
- Semenza, G.L., 2006. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. *Experimental Physiology* 91, 803–806.
- Semenza, G.L., 2011. Hypoxia. Cross talk between oxygen sensing and the cell cycle machinery. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 301, C550–552.
- Semenza, G.L., 2012. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 207–214.
- Semenza, G.L., 2017. A compendium of proteins that interact with HIF-1 α . *Experimental Cell Research, Cellular Hypoxia* 356, 128–135.
- Semenza, G.L., Nejfelt, M.K., Chi, S.M., Antonarakis, S.E., 1991. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *PNAS* 88, 5680–5684.
- Shen, Q., Goderie, S.K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., Temple, S., 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304, 1338–1340.

- Shi, X., Richard, J., Zirbes, K.M., Gong, W., Lin, G., Kyba, M., Thomson, J.A., Koyano-Nakagawa, N., Garry, D.J., 2014. Cooperative interaction of *Etv2* and *Gata2* regulates the development of endothelial and hematopoietic lineages. *Dev. Biol.* 389, 208–218.
- Shi, X., Zhang, Y., Zheng, J., Pan, J., 2012. Reactive oxygen species in cancer stem cells. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1215–1228.
- Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K., Inoue, Y., 1997. Glutamate Transporter GLAST Is Expressed in the Radial Glia–Astrocyte Lineage of Developing Mouse Spinal Cord. *J. Neurosci.* 17, 9212–9219.
- Shikama, N., Lee, C.-W., France, S., Delavaine, L., Lyon, J., Krstic-Demonacos, M., La Thangue, N.B., 1999. A Novel Cofactor for p300 that Regulates the p53 Response. *Mol. Cell* 4, 365–376.
- Shitamukai, A., Konno, D., Matsuzaki, F., 2011. Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J. Neurosci.* 31, 3683–3695.
- Siebzehnruhl Florian A., Silver Daniel J., Tugertimur Bugra, Deleyrolle Loic P., Siebzehnruhl Dorit, Sarkisian Matthew R., Devers Kelly G., Yachnis Antony T., Kupper Marius D., Neal Daniel, Nabils Nancy H., Kladde Michael P., Suslov Oleg, Brabletz Simone, Brabletz Thomas, Reynolds Brent A., Steindler Dennis A., 2013. The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance. *EMBO Molecular Medicine* 5, 1196–1212.
- Silver, D.L., Watkins-Chow, D.E., Schreck, K.C., Pierfelice, T.J., Larson, D.M., Burnetti, A.J., Liaw, H.-J., Myung, K., Walsh, C.A., Gaiano, N., Pavan, W.J., 2010. The exon junction complex component *Magoh* controls brain size by regulating neural stem cell division. *Nat. Neurosci.* 13, 551–558.
- Simon, M.C., Keith, B., 2008. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 285–296.
- Singh, R.P., Franke, K., Wielockx, B., 2012. Hypoxia-mediated regulation of stem cell fate. *High Alt. Med. Biol.* 13, 162–168.
- Smart, I.H., 1973. Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *J. Anat.* 116, 67–91.
- Sneddon, J.B., Werb, Z., 2007. Location, Location, Location: The Cancer Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell* 1, 607–611.
- So, K., Chung, Y., Yu, S.-K., Jun, Y., 2017. Regional Immunoreactivity of Pax6 in the Neurogenic Zone After Chronic Prenatal Hypoxia. *Vivo Athens Greece* 31, 1125–1129.
- Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Zohar, M., Bais, C., Mesri, E.A., Gutkind, J.S., 2000. The Kaposi's Sarcoma-associated Herpes Virus G Protein-coupled Receptor Up-Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Secretion through Mitogen-activated Protein Kinase and p38 Pathways Acting on Hypoxia-inducible Factor 1 α . *Cancer Res* 60, 4873–4880.
- Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R.D., Engh, J., Iwama, T., Kunisada, T., Kassam, A.B., Pollack, I.F., Park, D.M., 2009. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α . *Oncogene* 28, 3949–3959.
- Sofia Vala, I., Martins, L.R., Imaizumi, N., Nunes, R.J., Rino, J., Kuonen, F., Carvalho, L.M., Rüegg, C., Grillo, I.M., Barata, J.T., Mareel, M., Santos, S.C.R., 2010. Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis. *PLoS One* 5, e11222.
- Soni, S., Padwad, Y.S., 2017. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 56, 503–515.
- Sosa, M.A.G., Gasperi, R.D., Rocher, A.B., Perez, G.M., Simons, K., Cruz, D.E., Hof, P.R., Elder, G.A., 2007. Interactions of primary neuroepithelial progenitor and brain endothelial cells:

- distinct effect on neural progenitor maintenance and differentiation by soluble factors and direct contact. *Cell Research* 17, 619–626.
- Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., Possnert, G., Mash, D.C., Druid, H., Frisén, J., 2013. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219–1227.
- Speake, W.J., Dean, R.A., Kumar, A., Morris, T.M., Scholefield, J.H., Watson, S.A., 2005 a, b. Radiation induced MMP expression from rectal cancer is short lived but contributes to in vitro invasion. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* 31, 869–874. *vasion. Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* 31, 869–874.
- Squatrito, M., Brennan, C.W., Helmy, K., Huse, J.T., Petrini, J.H., Holland, E.C., 2010. Loss of ATM/Chk2/p53 Pathway Components Accelerates Tumor Development and Contributes to Radiation Resistance in Gliomas. *Cancer Cell* 18, 619–629.
- Srinivas, V., Zhang, L.P., Zhu, X.H., Caro, J., 1999. Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 557–561.
- Staab, A., Fleischer, M., Loeffler, J., Said, H., Katzer, A., Plathow, C., Einsele, H., Flentje, M., Vordermark, D., 2011. Small interfering RNA targeting HIF-1 α reduces hypoxia-dependent transcription and radiosensitizes hypoxic HT 1080 human fibrosarcoma cells in vitro. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* 187, 252–9.
- Starita, L.M., Machida, Y., Sankaran, S., Elias, J.E., Griffin, K., Schlegel, B.P., Gygi, S.P., Parvin, J.D., 2004. BRCA1-Dependent Ubiquitination of γ -Tubulin Regulates Centrosome Number. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8457–8466.
- Staudt, M.R., Sarkar, D., Fisher, P.B. 2007. Differentiation Therapy of Cancer: Journey from the Laboratory into the Clinic. *Advances in Gene, Molecular and Cell Therapy.* 1, 10-19.
- Steinle, M., Palme, D., Misovic, M., Rudner, J., Dittmann, K., Lukowski, R., Ruth, P., Huber, S.M., 2011. Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K⁺ channels. *Radiotherapy and Oncology* 101, 122–126.
- Stopschinski, B.E., Beier, C.P., Beier, D., 2013. Glioblastoma cancer stem cells--from concept to clinical application. *Cancer Lett.* 338, 32–40.
- Storch, A., Paul, G., Csete, M., Boehm, B.O., Carvey, P.M., Kupsch, A., Schwarz, J., 2001. Long-Term Proliferation and Dopaminergic Differentiation of Human Mesencephalic Neural Precursor Cells. *Experimental Neurology* 170, 317–325.
- Stoykova, A., Götz, M., Gruss, P., Price, J., 1997. Pax6-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain. *Dev. Camb. Engl.* 124, 3765–3777.
- Ströfer, M., Jelkmann, W., Metzen, E., Brockmeier, U., Dunst, J., Depping, R., 2011. Stabilisation and Knockdown of HIF - Two Distinct Ways Comparably Important in Radiotherapy. *CPB* 28, 805–812.
- Studer, L., Csete, M., Lee, S.-H., Kabbani, N., Walikonis, J., Wold, B., McKay, R., 2000. Enhanced Proliferation, Survival, and Dopaminergic Differentiation of CNS Precursors in Lowered Oxygen. *J. Neurosci.* 20, 7377–7383.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.-O., 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10, 459–466.

- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996.
- Sunabori, T., Tokunaga, A., Nagai, T., Sawamoto, K., Okabe, M., Miyawaki, A., Matsuzaki, Y., Miyata, T., Okano, H., 2008. Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. *Journal of Cell Science* 121, 1204–1212.
- Sundahl, N., Duprez, F., Ost, P., De Neve, W., Mareel, M., 2018. Effects of radiation on the metastatic process. *Mol. Med.* 24.
- Sutter, C.H., Laughner, E., Semenza, G.L., 2000. Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 97, 4748, 4748–4753.
- Suzuki, H., Tomida, A., Tsuruo, T., 2001. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1 α as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene* 20, 5779–5788.
- Syed, V., Mak, P., Du, C., Balaji, K.C., 2008. Beta-catenin mediates alteration in cell proliferation, motility and invasion of prostate cancer cells by differential expression of E-cadherin and protein kinase D1. *J. Cell. Biochem.* 104, 82–95.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., 1995. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J. Neurosci.* 15, 6046–6057.
- Takahashi, Y., Takahashi, S., Shiga, Y., Yoshimi, T., Miura, T., 2000. Hypoxic Induction of Prolyl 4-Hydroxylase α (I) in Cultured Cells. *J. Biol. Chem.* 275, 14139–14146.
- Takasaki, C., Kobayashi, M., Ishibashi, H., Akashi, T., Okubo, K., 2016. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α affects tumor proliferation and antiapoptosis in surgically resected lung cancer. *Mol Clin Oncol* 5, 295–300.
- Takasaki, C., Kobayashi, M., Ishibashi, H., Akashi, T., Okubo, K., 2016. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α affects tumor proliferation and antiapoptosis in surgically resected lung cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 5, 295–300.
- Takeda, N., Maemura, K., Imai, Y., Harada, T., Kawanami, D., Nojiri, T., Manabe, I., Nagai, R., 2004. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ. Res.* 95, 146–153.
- Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R.S., Hirao, A., Suematsu, M., Suda, T., 2010. Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 391–402.
- Tamamaki, N., Fujimori, K.E., Takauji, R., 1997. Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 8313–8323.
- Tan, X., Shi, S.-H., 2013. Neocortical neurogenesis and neuronal migration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2, 443–459.
- Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K., Murakami, F., 2003. Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development* 130, 5803–5813.
- Tang, C.-J.C., Fu, R.-H., Wu, K.-S., Hsu, W.-B., Tang, T.K., 2009. CPAP is a cell-cycle regulated protein that controls centriole length. *Nat. Cell Biol.* 11, 825–831.

- Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., Poellinger, L., 2000. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* 19, 4298–4309.
- Terzuoli, E., Puppo, M., Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Cao, L., Burger, A.M., Ziche, M., Melillo, G., 2010. Aminoflavone, a ligand of the aryl hydrocarbon receptor, inhibits HIF-1alpha expression in an AhR-independent fashion. *Cancer Res.* 70, 6837–6848.
- The Effect of Roentgen Irradiation on the Interrelation between Malignant Tumors and Their Hosts, 1930. *Radiology* 15, 506–506.
- Thomlinson, R.H., Gray, L.H., 1955. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br. J. Cancer* 9, 539–549.
- Tian, H., McKnight, S.L., Russell, D.W., 1997. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 11, 72–82.
- Tissir, F., Wang, C.-E., Goffinet, A.M., 2004. Expression of the chemokine receptor Cxcr4 mRNA during mouse brain development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 149, 63–71.
- Tiveron, M.-C., Rossel, M., Moepps, B., Zhang, Y.L., Seidenfaden, R., Favor, J., König, N., Cremer, H., 2006. Molecular Interaction between Projection Neuron Precursors and Invading Interneurons via Stromal-Derived Factor 1 (CXCL12)/CXCR4 Signaling in the Cortical Subventricular Zone/Intermediate Zone. *J. Neurosci.* 26, 13273–13278.
- Tomita, S., Ueno, M., Sakamoto, M., Kitahama, Y., Ueki, M., Maekawa, N., Sakamoto, H., Gassmann, M., Kageyama, R., Ueda, N., Gonzalez, F.J., Takahama, Y., 2003. Defective Brain Development in Mice Lacking the Hif-1 α Gene in Neural Cells. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6739–6749.
- Tsang, K.M., Hyun, J.S., Cheng, K.T., Vargas, M., Mehta, D., Ushio-Fukai, M., Zou, L., Pajcini, K.V., Rehman, J., Malik, A.B., 2017. Embryonic Stem Cell Differentiation to Functional Arterial Endothelial Cells through Sequential Activation of ETV2 and NOTCH1 Signaling by HIF1 α . *Stem Cell Reports* 9, 796–806.
- Tsunekawa, Y., Britto, J.M., Takahashi, M., Polleux, F., Tan, S.-S., Osumi, N., 2012. Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates. *The EMBO Journal* 31, 1879–1892.
- Tsutsumi, K., Tsuda, M., Yazawa, N., Nakamura, H., Ishihara, S., Haga, H., Yasuda, M., Yamazaki, R., Shirato, H., Kawaguchi, H., Nishioka, T., Ohba, Y., 2009. Increased motility and invasiveness in tumor cells that survive 10 Gy irradiation. *Cell Struct. Funct.* 34, 89–96.
- Tsuzuki, Y., Fukumura, D., Oosthuysen, B., Koike, C., Carmeliet, P., Jain, R.K., 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha--> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res.* 60, 6248–6252.
- Urbán, N., Guillemot, F., 2014. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci* 8.
- Uzquiano, A., Gladwyn-Ng, I., Nguyen, L., Reiner, O., Götz, M., Matsuzaki, F., Francis, F., 2018. Cortical progenitor biology: key features mediating proliferation versus differentiation. *J. Neurochem.*
- van Heyningen, V., Williamson, K.A., 2002. PAX6 in sensory development. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1161–1167.
- Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.-K., Wen, P.Y., Olson, J.J., 2010. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA. Cancer J. Clin.* 60, 166–193.
- Vasistha, N.A., García-Moreno, F., Arora, S., Cheung, A.F.P., Arnold, S.J., Robertson, E.J., Molnár, Z., 2015. Cortical and Clonal Contribution of Tbr2 Expressing Progenitors in the Developing Mouse Brain. *Cereb. Cortex* 25, 3290–3302.

- Velpula, K.K., Rehman, A.A., Chelluboina, B., Dasari, V.R., Gondi, C.S., Rao, J.S., Veeravalli, K.K., 2012. Glioma stem cell invasion through regulation of the interconnected ERK, integrin $\alpha 6$ and N-cadherin signaling pathway. *Cell. Signal.* 24, 2076–2084.
- Venkitaraman, A.R., 2001. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J. Cell Sci.* 114, 3591–3598.
- Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O’Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., Hayes, D.N., Cancer Genome Atlas Research Network, 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.
- Vilalta, M., Rafat, M., Graves, E.E., 2016. Effects of Radiation on Metastasis and Tumor Cell Migration. *Cell Mol Life Sci* 73, 2999–3007.
- Volm, M., Koomägi, R., 2000. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res.* 20, 1527–1533.
- Volman, V., Behrens, M.M., Sejnowski, T.J., 2011. Downregulation of parvalbumin at cortical GABA synapses reduces network gamma oscillatory activity. *J. Neurosci.* 31, 18137–18148.
- von Waechter, R., Jaensch, B., 1972. Generation times of the matrix cells during embryonic brain development: an autoradiographic study in rats. *Brain Res.* 46, 235–250.
- Vordermark, D., Katzer, A., Baier, K., Kraft, P., Flentje, M., 2004. Cell type-specific association of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein accumulation and radiobiologic tumor hypoxia. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 58, 1242–50.
- Wagenführ, L., Meyer, A.K., Braunschweig, L., Marrone, L., Storch, A., 2015. Brain oxygen tension controls the expansion of outer subventricular zone-like basal progenitors in the developing mouse brain. *Development* 142, 2904–2915.
- Wagenführ, L., Meyer, A.K., Marrone, L., Storch, A., 2016. Oxygen Tension Within the Neurogenic Niche Regulates Dopaminergic Neurogenesis in the Developing Midbrain. *Stem Cells Dev.* 25, 227–238.
- Walther, C., Gruss, P., 1991. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113, 1435–1449.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L., 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 5510–5514.
- Wang, G.L., Semenza, G.L., 1993. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82, 3610–3615.
- Wang, G.L., Semenza, G.L., 1993. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 4304–4308.
- Wang, G.L., Semenza, G.L., 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270, 1230–1237.
- Wang, G.L., Semenza, G.L., 1996. Molecular basis of hypoxia-induced erythropoietin expression. *Curr. Opin. Hematol.* 3, 156–162.
- Wang, R.-H., Yu, H., Deng, C.-X., 2004. A requirement for breast-cancer-associated gene 1 (BRCA1) in the spindle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17108–17113.
- Wang, X., Tsai, J.W., LaMonica, B., Kriegstein, A.R., 2011. A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex., A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat Neurosci* 14, 555, 555–561.

- Wang, Y., Wan, C., Deng, L., Liu, X., Cao, X., Gilbert, S.R., Bouxsein, M.L., Faugere, M.-C., Guldberg, R.E., Gerstenfeld, L.C., Haase, V.H., Johnson, R.S., Schipani, E., Clemens, T.L., 2007. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J. Clin. Invest.* 117, 1616–1626.
- Wegner, M., Stolt, C.C., 2005. From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends in Neurosciences* 28, 583–588.
- Wei, J., Yang, Y., Lu, M., Lei, Y., Xu, L., Jiang, Z., Xu, X., Guo, X., Zhang, X., Sun, H., You, Q., 2018. Recent Advances in the Discovery of HIF-1 α -p300/CBP Inhibitors as Anti-Cancer Agents. *Mini Rev Med Chem* 18, 296–309.
- Wen, J., Hu, Q., Li, M., Wang, S., Zhang, L., Chen, Y., Li, L., 2008. Pax6 directly modulate Sox2 expression in the neural progenitor cells. *Neuroreport* 19, 413–417.
- Wen, P.Y., Kesari, S., 2008. Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* 359, 492–507.
- Wenger, R.H., 2002. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *The FASEB Journal* 16, 1151–1162.
- Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M., Herrera, D.G., Alvarez-Buylla, A., 1999. Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat. Neurosci.* 2, 461–466.
- Wick, W., Wick, A., Schulz, J.B., Dichgans, J., Rodemann, H.P., Weller, M., 2002. Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase. *Cancer Res.* 62, 1915–1919.
- Wick, W., Wick, A., Schulz, J.B., Dichgans, J., Rodemann, H.P., Weller, M., 2002. Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase. *Cancer Res.* 62, 1915–1919.
- Wild-Bode, C., Weller, M., Rimner, A., Dichgans, J., Wick, W., 2001. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res.* 61, 2744–2750.
- Wonders, C., Anderson, S.A., 2005. Cortical interneurons and their origins. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 11, 199–205.
- Wonders, C.P., Taylor, L., Welagen, J., Mbata, I.C., Xiang, J.Z., Anderson, S.A., 2008. A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial ganglionic eminence. *Dev. Biol.* 314, 127–136.
- Wong, C.C.-L., Gilkes, D.M., Zhang, H., Chen, J., Wei, H., Chaturvedi, P., Fraley, S.I., Wong, C.-M., Khoo, U.-S., Ng, I.O.-L., Wirtz, D., Semenza, G.L., 2011. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16369–16374.
- Woodhead, G.J., Mutch, C.A., Olson, E.C., Chenn, A., 2006. Cell-Autonomous β -Catenin Signaling Regulates Cortical Precursor Proliferation. *J. Neurosci.* 26, 12620–12630.
- Woodworth, M.B., Greig, L.C., Kriegstein, A.R., Macklis, J.D., 2012. SnapShot: Cortical Development. *Cell* 151.
- Wrobel, C.N., Mutch, C.A., Swaminathan, S., Taketo, M.M., Chenn, A., 2007. Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Dev. Biol.* 309, 285–297.
- Wu, X., Tang, W., Marquez, R.T., Li, K., Highfill, C.A., He, F., Lian, J., Lin, J., Fuchs, J.R., Ji, M., Li, L., Xu, L., 2016. Overcoming chemo/radio-resistance of pancreatic cancer by inhibiting STAT3 signaling. *Oncotarget* 7, 11708–11723.
- Wülfing, P., Diallo, R., Kersting, C., Wülfing, C., Poremba, C., Rody, A., Greb, R.R., Böcker, W., Kiesel, L., 2003. Expression of endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B receptor in human

- breast cancer and correlation with long-term follow-up. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 4125–4131.
- Xie, Y., Jüsckhe, C., Esk, C., Hirotsune, S., Knoblich, J.A., 2013. The phosphatase PP4c controls spindle orientation to maintain proliferative symmetric divisions in the developing neocortex. *Neuron* 79, 254–265.
- Xu, H., Rahimpour, S., Nesvick, C.L., Zhang, X., Ma, J., Zhang, M., Zhang, G., Wang, L., Yang, C., Hong, C.S., Germanwala, A.V., Elder, J.B., Ray-Chaudhury, A., Yao, Y., Gilbert, M.R., Lonser, R.R., Heiss, J.D., Brady, R.O., Mao, Y., Qin, J., Zhuang, Z., 2015. Activation of hypoxia signaling induces phenotypic transformation of glioma cells: implications for bevacizumab antiangiogenic therapy. *Oncotarget* 6, 11882–11893.
- Xu, Q., Cobos, I., De La Cruz, E., Rubenstein, J.L., Anderson, S.A., 2004. Origins of cortical interneuron subtypes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 2612–2622.
- Xu, X., Weaver, Z., Linke, S.P., Li, C., Gotay, J., Wang, X.W., Harris, C.C., Ried, T., Deng, C.X., 1999. Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol. Cell* 3, 389–395.
- Yamamoto, T., 1936, Experimental study on effect of X-ray on metastasis of malignant tumor, especially in bones. *Japanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, **19**, 559–569.
- Yamashita, K., Discher, D.J., Hu, J., Bishopric, N.H., Webster, K.A., 2001. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J. Biol. Chem.* 276, 12645–12653.
- Yamashita, T., Ohneda, O., Nagano, M., Iemitsu, M., Makino, Y., Tanaka, H., Miyauchi, T., Goto, K., Ohneda, K., Fujii-Kuriyama, Y., Poellinger, L., Yamamoto, M., 2008. Abnormal heart development and lung remodeling in mice lacking the hypoxia-inducible factor-related basic helix-loop-helix PAS protein NEPAS. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1285–1297.
- Yang, L., Lin, C., Wang, L., Guo, H., Wang, X., 2012. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications. *Experimental Cell Research* 318, 2417–2426.
- Yang, M.-H., Wu, M.-Z., Chiou, S.-H., Chen, P.-M., Chang, S.-Y., Liu, C.-J., Teng, S.-C., Wu, K.-J., 2008. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat. Cell Biol.* 10, 295–305.
- Yang, X., Yang, S., Wang, C., Kuang, S., 2017. The hypoxia-inducible factors HIF1 α and HIF2 α are dispensable for embryonic muscle development but essential for postnatal muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* 292, 5981–5991.
- Yao, H., Zeng, Z.-Z., Fay, K.S., Veine, D.M., Staszewski, E.D., Morgan, M., Wilder-Romans, K., Williams, T.M., Spalding, A.C., Ben-Josef, E., Livant, D.L., 2011. Role of $\alpha(5)\beta(1)$ Integrin Up-regulation in Radiation-Induced Invasion by Human Pancreatic Cancer Cells. *Transl Oncol* 4, 282–292.
- Yin, W., Ma, L., Zhang, J., Huang, K., Yang, Q., Guo, Y.-Y., Liu, S.-B., Liu, Y.-H., Wu, Y.-M., 2013. The migration of neural progenitor cell mediated by SDF-1 is NF- κ B/HIF-1 α dependent upon hypoxia. *CNS Neurosci. Ther.* 19, 145–153.
- Yingling, J., Youn, Y.H., Darling, D., Toyo-Oka, K., Prampero, T., Hirotsune, S., Wynshaw-Boris, A., 2008. Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division. *Cell* 132, 474–486.
- Yip, S., Miao, J., Cahill, D.P., Iafrate, A.J., Aldape, K., Nutt, C.L., Louis, D.N., 2009. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 4622–4629.
- Yip, S., Miao, J., Cahill, D.P., Iafrate, A.J., Aldape, K., Nutt, C.L., Louis, D.N., 2009. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 4622–4629.

- Yokota, Y., Gashghaei, H.T., Han, C., Watson, H., Campbell, K.J., Anton, E.S., 2007. Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex. *PLoS One* 2, e794.
- Yoon, K., Gaiano, N., 2005. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat. Neurosci.* 8, 709–715.
- Yoshida, T., Kuwahara, M., Maita, K., Harada, T., 2001. Immunohistochemical study on hypoxia in spontaneous polycystic liver and kidney disease in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 53, 123–128.
- Yoshii, Y., Saito, A., Hyodo, A., Tsurushima, H., Sun, L., 2001. Expression of enzymes and oncogene induced after radiotherapy and/or chemotherapy in patients with brain tumors. *Hum. Cell* 14, 95–103.
- Yoshii, Y., Saito, A., Zhao, D.W., Nose, T., 1999. Copper/Zinc Superoxide Dismutase, Nuclear DNA Content, and Progression in Human Gliomas. *J. Neurooncol.* 42, 103–108.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., Dailey, L., 1995. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* 9, 2635–2645.
- Yun, Z., Maecker, H.L., Johnson, R.S., Giaccia, A.J., 2002. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev. Cell* 2, 331–341.
- Zagzag, D., Zhong, H., Scalzitti, J.M., Laughner, E., Simons, J.W., Semenza, G.L., 2000. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* 88, 2606–2618.
- Zaman, K., Ryu, H., Hall, D., O'Donovan, K., Lin, K.-I., Miller, M.P., Marquis, J.C., Baraban, J.M., Semenza, G.L., Ratan, R.R., 1999. Protection from Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Cortical Neuronal Cultures by Iron Chelators Is Associated with Enhanced DNA Binding of Hypoxia-Inducible Factor-1 and ATF-1/CREB and Increased Expression of Glycolytic Enzymes, p21waf1/cip1, and Erythropoietin. *J. Neurosci.* 19, 9821–9830.
- Zhai, G.G., Malhotra, R., Delaney, M., Latham, D., Nestler, U., Zhang, M., Mukherjee, N., Song, Q., Robe, P., Chakravarti, A., 2006. Radiation Enhances the Invasive Potential of Primary Glioblastoma Cells via Activation of the Rho Signaling Pathway. *J Neurooncol* 76, 227–237.
- Zhang, C., Zhu, L., Zhao, T., Zhao, H., Huang, X., Ma, X., Wang, H., Fan, M., 2006. Characteristics of Neural Stem Cells Expanded in Lowered Oxygen and the Potential Role of Hypoxia-Inducible Factor-1Alpha. *NSG* 15, 259–265.
- Zhang, H., Qian, D.Z., Tan, Y.S., Lee, K., Gao, P., Ren, Y.R., Rey, S., Hammers, H., Chang, D., Pili, R., Dang, C.V., Liu, J.O., Semenza, G.L., 2008. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 19579–19586.
- Zhang, H., Wong, C.C.L., Wei, H., Gilkes, D.M., Korangath, P., Chaturvedi, P., Schito, L., Chen, J., Krishnamachary, B., Winnard, P.T., Raman, V., Zhen, L., Mitzner, W.A., Sukumar, S., Semenza, G.L., 2012. HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. *Oncogene* 31, 1757–1770.
- Zhang, J., Fei, T., Li, Z., Zhu, G., Wang, L., Chen, Y.-G., 2013. BMP Induces Cochlin Expression to Facilitate Self-renewal and Suppress Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* 288, 8053–8060.
- Zhang, J., Jiao, J., 2015. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Res Int* 2015.
- Zhang, J., Stevens, M.F.G., Laughton, C.A., Madhusudan, S., Bradshaw, T.D., 2010. Acquired Resistance to Temozolomide in Glioma Cell Lines: Molecular Mechanisms and Potential Translational Applications. *Oncology* 78, 103–114.

- Zhang, S., Zhou, X., Wang, B., Zhang, K., Liu, S., Yue, K., Zhang, L., Wang, X., 2014. Loss of VHL expression contributes to epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 50, 809–817.
- Zhang, X., Kon, T., Wang, H., Li, F., Huang, Q., Rabbani, Z., Kirkpatrick, J., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M., Li, C.-Y., 2004. Enhancement of hypoxia-induced tumor cell death in vitro and radiation therapy in vivo by use of small interfering RNA targeted to hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer research* 64, 8139–42.
- Zhang, Y., Liu, Q., Wang, Fuwu, Ling, E.-A., Liu, S., Wang, L., Yang, Y., Yao, L., Chen, X., Wang, Fen, Shi, W., Gao, M., Hao, A., 2013. Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1 α . *Journal of Pineal Research* 55, 121–130.
- Zhao, C., Deng, W., Gage, F.H., 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645–660.
- Zhao, Q., Mao, A., Guo, R., Zhang, L., Yan, J., Sun, C., Tang, J., Ye, Y., Zhang, Y., Zhang, H., 2017. Suppression of radiation-induced migration of non-small cell lung cancer through inhibition of Nrf2-Notch Axis. *Oncotarget* 8, 36603–36613.
- Zhao, T., Zhang, C., Liu, Z., Wu, L., Huang, X., Wu, H., Xiong, L., Wang, Xuan, Wang, Xiao-min, Zhu, L., Fan, M., 2008. Hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells—role of hypoxia-inducible transcription factor-1alpha. *FEBS J.* 275, 1824–1834.
- Zhao, Y., Matsuo-Takasaki, M., Tsuboi, I., Kimura, K., Salazar, G.T., Yamashita, T., Ohneda, O., 2014. Dual functions of hypoxia-inducible factor 1 alpha for the commitment of mouse embryonic stem cells toward a neural lineage. *Stem Cells Dev.* 23, 2143–2155.
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.M., Simons, J.W., Semenza, G.L., 2000. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 60, 1541–1545.
- Zhong, W., Yan, T., Lim, R., Oberley, L.W., 1999. Expression of superoxide dismutases, catalase, and glutathione peroxidase in glioma cells. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1334–1345.
- Zhou, L.-Y., Wang, Z.-M., Gao, Y.-B., Wang, L.-Y., Zeng, Z.-C., 2012. Stimulation of hepatoma cell invasiveness and metastatic potential by proteins secreted from irradiated nonparenchymal cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 84, 822–828.
- Zhou, Q.-Z., Zhang, G., Long, H.-B., Lei, F., Ye, F., Jia, X.-F., Zhou, Y.-L., Kang, J.-P., Feng, D.-X., 2014. Effect of spinal cord extracts after spinal cord injury on proliferation of rat embryonic neural stem cells and Notch signal pathway in vitro. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7, 562–567.
- Zhou, X., Liu, Z., Shi, Q., Jiao, J., Bian, W., Song, X., Mo, J., Sang, B., Xu, Y., Qian, J., Chao, Y., Yu, R., 2013. Geranylgeranyltransferase I regulates HIF-1 α promoting glioblastoma cell migration and invasion. *J Neurooncol* 112, 365–374.
- Zhou, Y., 2012. Cortical development and asymmetric cell divisions. *Front. Biol.* 7, 297–306.
- Zhou, Y.-C., Liu, J.-Y., Li, J., Zhang, J., Xu, Y.-Q., Zhang, H.-W., Qiu, L.-B., Ding, G., Su, X.-M., Mei-Shi, Guo, G.-Z., 2011. Ionizing Radiation Promotes Migration and Invasion of Cancer Cells Through Transforming Growth Factor-Beta–Mediated Epithelial–Mesenchymal Transition. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 81, 1530–7.
- Zhu, L.-L., Wu, L.-Y., Yew, D.T., Fan, M., 2005. Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs. *Mol. Neurobiol.* 31, 231–242.
- Ziegler, E.C., Ghosh, S., 2005. Regulating inducible transcription through controlled localization. *Sci. STKE* 2005, re6.

- Zinkernagel, A.S., Johnson, R.S., Nizet, V., 2007. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J. Mol. Med.* 85, 1339–1346.
- Zöller, M., 2011. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* 11, 254–267.
- Zouaoui, S., Rigau, V., Mathieu-Daudé, H., Darlix, A., Bessaoud, F., Fabbro-Peray, P., Bauchet, F., Kerr, C., Fabbro, M., Figarella-Branger, D., Taillandier, L., Duffau, H., Trétarre, B., Bauchet, L., Société française de neurochirurgie (SFNC) et le Club de neuro-oncologie de la SFNC, Société française de neuropathologie (SFNP), Association des neuro-oncologues d'expression française (ANOCEF), 2012. [French brain tumor database: general results on 40,000 cases, main current applications and future prospects]. *Neurochirurgie.* 58, 4–13.
- Zuchero, J.B., Coutts, A.S., Quinlan, M.E., Thangue, N.B.L., Mullins, R.D., 2009. p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat. Cell Biol.* 11, 451–459.
- Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A.R., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Jefferson, A.B., Stokoe, D., Giaccia, A.J., 2000. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 14, 391–3

