



Le docteur Cédric Blanpain, de l'Université libre de Bruxelles, et deux membres de son équipe : Panagiota Sotiropoulou et Aurélie Candi.

Les cellules souches font de la résistance

Dans un article récent (1) publié par Nature Cell Biology, l'équipe du docteur Cédric Blanpain, de l'Université libre de Bruxelles, fait part de sa découverte de nouvelles propriétés caractéristiques de certaines cellules souches adultes en réponse aux dommages occasionnés à leur ADN. Une avancée dans l'élucidation des mécanismes de la cancérisation et du vieillissement

Texte : Philippe LAMBERT • ph.lambert.ph@skynet.be

Photos : Ph. LAMBERT (p.36), REPORTERS (pp.36 à 38)

La plupart des tissus adultes contiennent des cellules souches (SCs) qui assurent le renouvellement des cellules mortes ou endommagées et la réparation des tissus de l'organisme après lésion. Une de leurs caractéristiques est de résider et de se diviser durant de longues périodes au sein de leur tissu d'appartenance, ce qui les expose à un risque important d'accumulation de mutations susceptibles de mener au développement de cancers ou au vieillissement. On connaît cependant très peu la manière dont elles répondent *in vivo*, dans leur niche naturelle, aux dommages occasionnés à leur ADN. Quelles sont les conséquences fonctionnelles de tels dommages sur les cellules souches et quels mécanismes moléculaires ces dernières mettent-elles en œuvre quand elles y sont exposées ? Voilà les questions clés sur lesquelles s'est penchée récemment une équipe de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire (IRIBHM) de l'Université libre de Bruxelles (ULB).

Les chercheurs se sont concentrés sur les cellules souches résidant dans une région spécialisée du follicule pileux appelée, en anglais, le «bulge». Cette population est très bien caractérisée et constitue un

réservoir de cellules souches multipotentes capables de se différencier pour donner naissance à l'ensemble des lignées cellulaires de l'épiderme. De tous les dommages à l'ADN, ceux dont les caractéristiques sont les mieux connues sont les cassures double brin. Aussi le groupe du docteur Cédric Blanpain, chercheur qualifié au Fonds national de la recherche scientifique (FNRS), a-t-il étudié, chez la souris, l'effet de ces dommages, induits par radiations ionisantes, sur la réponse des SCs du follicule pileux.

Arrêt prématuré

On sait qu'il existe chez toutes les cellules eucaryotes (possédant un noyau structuré) un mécanisme puissant qui détecte les dommages à l'ADN, en avertit la cellule, répare les lésions afin d'assurer l'intégrité du génome et, si les dommages sont trop étendus, conduit la cellule soit à la mort cellulaire programmée (apoptose), soit à l'arrêt définitif du cycle cellulaire (sénescence), soit encore à l'induction de sa différenciation prématurée. «Des mutations au niveau des gènes contrôlant les étapes de la réponse cellulaire aux dommages occasionnés à l'ADN ont été associées à différentes

pathologies humaines, comme une accélération du vieillissement, des maladies neurodégénératives et le cancer», précise Cédric Blanpain.

Les chercheurs de son groupe ont exposé à des radiations ionisantes des souris âgées de sept semaines, au moment où les cellules souches du *bulge* sont très peu prolifératives ou encore quiescentes (au repos). L'accumulation de dommages à l'ADN s'est traduit par un profond arrêt du cycle cellulaire, durant 96 heures, dans toutes les cellules de l'épiderme, y compris les SCs du *bulge*. À des temps précoces après irradiation, ces dernières ont commencé à mourir, mais dans une moindre mesure cependant que les autres cellules de l'épiderme. En outre, à partir de 12 heures après l'accumulation de dommages à l'ADN, le taux d'apoptose a drastiquement diminué dans la population de SCs, au point de devenir indétectable après 24 heures. En revanche, la mort cellulaire s'est maintenue durant plusieurs jours au sein de la population des cellules différenciées de l'épiderme.

Pourquoi donc cet arrêt prématuré de l'apoptose chez les cellules souches adultes du follicule pileux ? Fallait-il incriminer des facteurs génétiques dans la mesure où l'on sait que, selon leur lignée, les souris manifestent des différences de sensibilité aux radiations ionisantes ? Pour répondre à cette question, plusieurs lignées ont été étudiées. Aucun écart significatif n'a été observé entre elles dans la réponse des SCs du *bulge* 7 et 24 heures après l'irradiation. La composante génétique de la lignée murine était donc sans influence sur la résistance de ces cellules souches à l'apoptose.

Depuis longtemps, il est acquis que la sensibilité des cellules aux dommages causés à leur l'ADN est corrélée avec leur taux de prolifération. Dès lors, plus celui-ci est élevé, plus les cellules sont sensibles aux radiations ionisantes. D'où la possibilité que la quiescence des SCs du *bulge* durant la période de repos du cycle de renouvellement du poil puisse expliquer l'arrêt précoce de l'apoptose. «Les SCs du *bulge* prolifèrent activement durant la phase de régénération du poil, indique Cédric Blanpain. Nous avons irradié des souris pendant cette période. Comme les autres cellules de l'épiderme, les cellules souches sont entrées en arrêt

du cycle cellulaire, mais, une fois encore, se sont montrées profondément résistantes à l'apoptose. De surcroît, nous les avons soumises à un traitement de cinq jours à base de 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) afin de stimuler leur prolifération avant de les irradier. L'arrêt précoce du processus de mort cellulaire n'a pas été inhibé pour autant.» Bref, l'explication postulant un effet de la quiescence des SCs sur l'arrêt de l'apoptose n'était pas la bonne non plus.

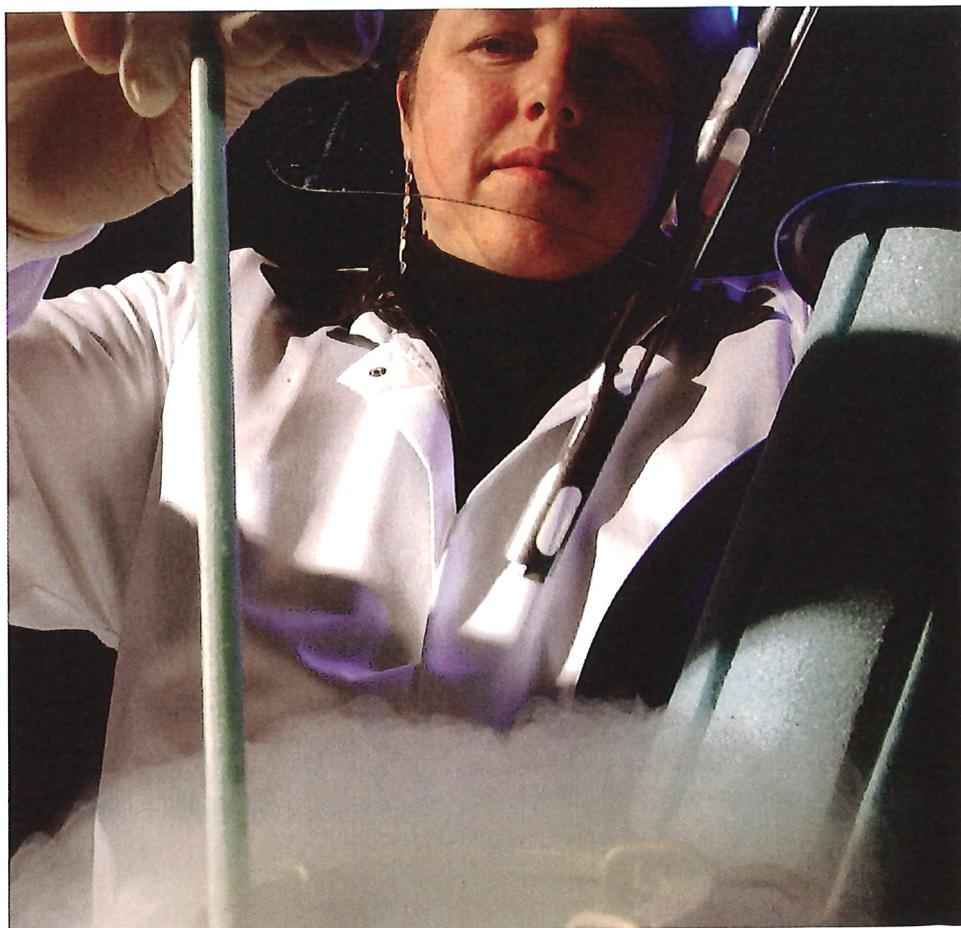
Hypothèses démenties

Troisième possibilité: plutôt que de se soumettre à l'apoptose, les SCs du *bulge* deviendraient sénescentes (vieillissantes), préservant ainsi de façon temporaire l'architecture de l'épiderme. Comme l'a démontré un faisceau d'observations expérimentales, cette piste a abouti, elle aussi, dans un cul-de-sac. Par exemple, après irradiation, les cellules souches du *bulge* n'ont dévoilé aucune élévation de l'activité de la β -galactosidase, enzyme dont l'activité spécifique est associée à la sénescence. De même, leur régénération n'a nullement été compromise par les radiations ionisantes, comme a

permis de le conclure l'accroissement normal du pourcentage de follicules pileux en phase de maturation quelques semaines après irradiation. Par ailleurs, les chercheurs ont activé la prolifération des cellules de l'épiderme par un traitement à basé de TPA. Qu'ont-ils constaté ? Que les SCs du *bulge* des souris contrôles et des souris irradiées incorporaient de manière similaire la bromodeoxyuridine, nucléoside synthétique utilisé pour détecter les cellules en prolifération dans un tissu vivant.

Autrement dit, l'administration ponctuelle d'un rayonnement ionisant ne réduisait pas les capacités des cellules souches du *bulge* de proliférer en réponse à des signaux inducteurs de la mitose (division cellulaire). «Mieux encore, l'administration répétée de radiations ionisantes pendant trois ou dix semaines consécutives ne réduit pas non plus l'aptitude des SCs à proliférer naturellement ou après avoir été stimulées au moyen de TPA», rapporte Cédric Blanpain. La sénescence n'est donc pas la voie suivie par ces cellules souches en réponse aux dommages occasionnés à leur ADN.

Étaient-elles alors au centre d'un phénomène de différenciation prématurée analogue à celui mis récemment en





38

évidence chez les cellules souches des mélanocytes lorsque leur ADN a essuyé des dommages identiques ? La question était d'autant plus fondée que les unes et les autres partagent la même localisation. La réponse fut néanmoins à nouveau négative, suggérant que les propriétés intrinsèques des SCs d'un tissu spécifique revêtent plus d'importance que celles de leur environnement dans le contrôle de leur réponse fonctionnelle aux dommages causés à leur ADN.

Enfin, les chercheurs ont entrepris de déterminer si la résistance à l'apoptose était la résultante d'une perte de l'expression de la protéine CD34, marqueur membranaire des cellules du *bulge* et, en conséquence, de la migration des cellules souches du *bulge* en dehors de leur niche vers le compartiment plus différencié. Hypothèse démentie une fois encore.

Bcl-2 et P53

Devant l'échec de toutes les tentatives d'explication susmentionnées, le groupe de Cédric Blanpain, au sein duquel Panagiota Sotiropoulou et Aurélie Candi, premiers auteurs de l'article paru dans *Nature Cell Biology*, ont joué un rôle majeur, s'est interrogé sur la réalité des

dommages à l'ADN qu'étaient censées avoir subis les SCs du follicule pileux. Cette fois, la réponse a toutefois été résolument affirmative, dans la mesure où ces cellules activaient normalement - c'est-à-dire comme les autres cellules de l'épiderme - l'expression de p53, gène suppresseur de tumeur communément appelé le «gardien du génome» - son rôle est d'induire l'expression de facteurs stimulant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.

«Nous avons alors pensé que la cause de la résistance des cellules souches du bulge à l'apoptose était peut-être qu'elles exprimaient plus de facteurs anti-apoptotiques que les autres cellules de l'épiderme», explique Cédric Blanpain. En effet, la mort cellulaire programmée se situe au cœur d'une interaction entre facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Parmi ces derniers, l'un des mieux connus est la protéine Bcl-2, dont le gène est situé sur le chromosome 18. Or qu'ont observé les biologistes de l'IRIBHM ? Précisément que les SCs du *bulge* exprimaient Bcl-2 de façon significativement plus élevée que ne le faisaient les autres cellules épidermiques. Aussi, dans la foulée, ont-ils étudié les conséquences fonctionnelles de radiations ionisantes chez des souris transgéniques déficientes en Bcl-2. Résultat: une plus grande sensibilité des cellules

souches du *bulge* à la mort cellulaire programmée. «Une conclusion s'imposait, dit Cédric Blanpain: de plus hauts niveaux de Bcl-2 sont en partie responsables de la résistance de ces cellules à l'apoptose induite par les dommages occasionnés à leur ADN. Cela explique notamment pourquoi la mort cellulaire est moins massive chez les SCs que chez les autres cellules de l'épiderme dans les premiers temps après l'irradiation, mais pas la séquence temporelle qui aboutit à l'arrêt précoce de l'apoptose.»

Un autre mécanisme devait donc intervenir, en sus. Lequel ? Une possibilité envisagée par les chercheurs de l'ULB était que l'activation du gène p53 après l'irradiation aie été plus transitoire dans les SCs du *bulge*. Tel était bien le cas. De fait, l'abondance de p53, initialement «normale» en réponse aux dommages causés à leur ADN, y déclinait plus rapidement pour devenir à peine détectable 24 heures après l'irradiation, alors que la protéine continuait à être fortement exprimée dans les autres cellules différenciées de l'épiderme. Encore fallait-il prouver que ce phénomène contribuait réellement à la résistance des cellules souches du *bulge* à l'apoptose. Pour ce faire, les chercheurs ont eu recours à un modèle de souris transgéniques qui leur ont permis d'augmenter artificiellement l'abondance de p53 dans les cellules souches du follicule pileux. Dans ces conditions, les SCs du *bulge* continuaient à mourir au-delà de 24 heures après l'irradiation, à l'image des autres cellules épidermiques et qui plus est, selon le même schéma temporel que ces dernières.

Entre réparation et erreurs

Restait à trouver l'origine de la chute rapide de l'expression de p53 dans les cellules souches du follicule pileux des souris normales (non génétiquement modifiées) dont l'ADN avait subi des cassures double brin. Comme des boucles de rétrocontrôle négatif sont présentes dans la quasi-totalité des systèmes biologiques, une possibilité aurait été l'intervention, au niveau des SCs concernées, d'une telle boucle, qui se serait révélée très active. «Nous n'avons pu dégager aucun argument en ce sens,

mais cela n'exclut pas pour autant qu'un tel phénomène puisse éventuellement avoir cours», indique le responsable du groupe de recherche.

Une autre hypothèse explicative du fait que l'activation de p53 est de beaucoup plus courte durée dans les cellules souches du follicule pileux serait que les lésions de leur ADN sont réparées plus rapidement que celles des autres cellules épidermiques. Et c'est bien ce qui se produit. Afin de le vérifier, les chercheurs de l'IRIBHM ont évalué par immunofluorescence l'expression de γ -H2AX à différents moments après l'irradiation des souris, le taux de cette protéine étant corrélé avec la persistance de cassures double brin non réparées. Il est apparu que les foyers de γ -H2AX disparaissaient plus vite dans les SCs du *bulge* que dans les autres cellules de l'épiderme, accréditant ainsi l'hypothèse émise.

Deux mécanismes président à la réparation des cassures double brin: la recombinaison homologue (HR), qui s'avère très fidèle mais ne peut s'opérer que quand les chromosomes sont appariés en mitose, et la jonction des terminaisons non homologue (NHEJ), qui est sujette aux erreurs. La majorité des cellules en phase de quiescence voient les cassures double brin de leur ADN réparées par NHEJ. Or la plupart des cellules de l'épiderme sont le plus souvent quiescentes. Plusieurs essais indépendants ont permis au groupe de Cédric Blanpain de montrer que l'activité de ce mécanisme de NHEJ était particulièrement soutenue dans les SCs du *bulge* après irradiation des souris et qu'elle était associée à un niveau d'expression élevé de DNA-PK, une des protéines clés de cette voie de réparation.

Afin de déterminer si le plus haut niveau d'activation de DNA-PK dans ces cellules était bien responsable de la réparation plus rapide de leur ADN et, de façon subséquente, de leur plus grande résistance à l'apoptose, les chercheurs de l'ULB ont administré des radiations ionisantes à des souris transgéniques qui portent une mutation ponctuelle du gène codant pour DNA-PK. «Cette mutation induit une diminution d'environ 50% de l'activité de la protéine et une augmentation de l'apoptose», rapporte Cédric Blanpain. Par comparaison avec les souris contrôles, les souris transgéniques manifestaient une carence dans la répara-

tion de leur ADN au niveau des cellules souches du *bulge*, lesquelles abritaient de nombreux foyers de γ -H2AX vingt-quatre heures après l'irradiation. La présence de lésions de l'ADN non réparées dans les SCs s'accompagnait d'une expression soutenue de p53 et d'un accroissement de l'apoptose.»

Quelles perspectives ?

En langage imagé, nous pourrions dire que les cellules souches du follicule pileux «veulent survivre à tout prix». Elles y arrivent d'ailleurs très bien, mais à l'aide d'un mécanisme de réparation de l'ADN propice aux erreurs. À long terme, le risque d'accumulation de mutations dans ces cellules est non négligeable. L'arme est donc à double tranchant, dans la mesure où un bénéfice immédiat (la survie de la cellule) peut se réaliser aux dépens de la maintenance de l'intégrité génomique à long terme. En d'autres mots, l'accumulation de mutations pourrait favoriser l'apparition de cancers et le vieillissement. «Quand on pense à l'évolution, ce mécanisme de protection des cellules souches a beaucoup de sens», souligne Panagiota Sotiropoulou. Il y a plusieurs centaines d'années, le vieillissement et le cancer ne représentaient pas un problème de survie pour l'homme, son espérance de vie ne dépassant pas 30 ans. Il était bien plus important de protéger les cellules souches de la mort cellulaire que d'éviter de nouvelles mutations dans leurs génomes.»

À la suite de la découverte des chercheurs de l'IRIBHM se posent plusieurs questions primordiales. La première est de savoir si, comme on le pressent, la résistance des cellules souches du follicule pileux à l'apoptose est effectivement une cause de cancérisation. «Nous travaillons actuellement sur le sujet», précise Cédric Blanpain. Et pour autant que, ayant accumulé des mutations, les SCs du *bulge* aient pour possible destin de devenir des cellules souches cancéreuses, celles-ci conservent-elles les mêmes facultés de résistance à la mort cellulaire que les «cellules de départ», ce qui pourrait peut-être expliquer en partie le relatif échec des traitements anticancéreux classiques (radiothérapie, chimiothérapie) dont le principe consiste à provoquer des dommages à l'ADN ? «Théoriquement, on pourrait alors tenter d'inhiber la résistance à l'apoptose

chez les cellules souches cancéreuses dans le but d'améliorer l'efficacité des thérapies anticancéreuses», considère Cédric Blanpain.

Autre point essentiel: dans quelle mesure le mécanisme de réparation de l'ADN et de résistance à la mort cellulaire mis en lumière chez les SCs du follicule pileux est-il partagé par d'autres types de cellules souches adultes, que ce soit au niveau de la peau ou au niveau d'autres tissus ? En fait, il semble que ces cellules, selon leur nature, développent des stratégies différentes pour répondre aux lésions de leur ADN. Ainsi, les SCs de l'intestin meurent massivement après irradiation, tandis que dans les mêmes circonstances, les cellules souches du mélanocyte se différencient prématurément au sein de leur niche. «Si l'on s'aventure à la lisière de la science-fiction, on pourrait imaginer, par exemple, d'augmenter l'expression de la protéine Bcl-2 dans l'intestin pour protéger les cellules souches lorsqu'on traite un patient par radiothérapie ou chimiothérapie pour le cancer d'un autre organe», confie notre interlocuteur.

Cela étant, les résultats préliminaires (non encore publiés) de plusieurs équipes semblent indiquer que le mécanisme décrit par les biologistes de l'ULB chez les SCs du *bulge* ne serait pas isolé mais commun à d'autres cellules souches adultes. L'élucidation des mécanismes de la cancérisation et du vieillissement se poursuit... ■

(1) Bcl-2 and accelerated DNA repair mediates resistance of hair follicle bulge stem cells to DNA-damage-induced cell death, par Panagiota A Sotiropoulou, Aurélie Candi, Guilhem Mascré, Sarah De Clercq, Khalil Kass Youssef, Gaëlle Lapouge, Ellen Dahl, Claudio Semeraro, Geertrui Denecker, Jean-Christophe Marine et Cédric Blanpain, dans Nature Cell Biology, 2010.