



HAL
open science

Caractérisation des cellules souches cancéreuses de la peau humaine : Implication de la voie de signalisation de l'Epidermal Growth Factor Receptor dans le contrôle de la différenciation des cellules souches de l'épiderme

Hélène Le Roy

► To cite this version:

Hélène Le Roy. Caractérisation des cellules souches cancéreuses de la peau humaine : Implication de la voie de signalisation de l'Epidermal Growth Factor Receptor dans le contrôle de la différenciation des cellules souches de l'épiderme. Biologie cellulaire. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT : . tel-00596381

HAL Id: tel-00596381

<https://theses.hal.science/tel-00596381>

Submitted on 27 May 2011

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

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

Université du droit et de la santé – Lille2

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Hélène LE ROY

Le 22 juillet 2009

Titre :

Caractérisation des cellules souches cancéreuses de la peau humaine : Implication de la voie de signalisation de l'Epidermal Growth Factor Receptor dans le contrôle de la différenciation des cellules souches de l'épiderme

Membres du Jury

Président : Pr. Pierre Formstecher

Rapporteur : Pr. Marie-Hélène Ratinaud

Rapporteur : Dr. Philippe Jay

Directeur de thèse : Dr. Renata Polakowska

Je voudrais remercier les membres de mon jury de thèse. Merci donc à Madame le Professeur Marie-Hélène Ratinaud et à Monsieur le Docteur Philippe Jay de s'être déplacés du sud au nord de la France pour assister à ma soutenance de thèse et avoir accepté de lire mon manuscrit, même rendu en retard, relatant mes résultats de thèse.

Je souhaite ensuite remercier l'Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) et la région Nord-Pas de Calais ainsi que l'Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille qui m'ont financée lors de mon doctorat.

Merci au Professeur Pierre Formstecher pour son accueil au sein de son laboratoire et pour son support scientifique tout au long de mon doctorat.

Merci spécial au Docteur Renata Polakowska, mon tuteur de doctorat pour tout ce qu'elle m'a enseigné au cours de ces cinq années passées dans son équipe de recherche. Merci d'avoir gardé confiance en moi.

Merci à Hélène Obriot et Susan Famiji, mes guides pour me repérer dans cette jungle qu'est le laboratoire quand on débute.

A tout le personnel (ancien et actuel) de l'U459, 814 puis 837 Equipe 4 pour sa bonne humeur et bonne ambiance, merci de m'avoir soutenue, écoutée et supportée. Merci à mes voisins de paillasse, de bureau et merci pour toutes les oreilles qui ont écouté mes critiques, mes bons moments et mes angoisses. Merci.

Un grand merci à Martine, Florence, Bernadette et Pascaline pour leur aide technique et leur contribution à l'avancement rigoureux de mes travaux.

Merci aux étudiants qui m'ont acceptée comme encadrant. J'espère avoir été ferme mais sympathique. En tout cas pour moi ça m'a fait découvrir les joies de transmettre mes connaissances et mon plaisir de travailler dans la recherche. Merci à Laurie, Nathan, Sonia, Annie.

Merci à tout le personnel du centre Jean-Pierre Aubert. J'y ai fait de grandes rencontres amicales et professionnelles.

Merci à l'IFR114 pour l'apport de tous ses équipements, sans eux mon travail n'aurait pas été aussi riche. Merci à Maud Collyn pour la gestion de l'IFR, à Harold pour la microscopie confocale et le Time Lapse, merci à Anne-Sophie Druckberg et à Pierre-Marie Danze pour les puces Superarrays.

Un merci particulier à Nathalie Jouy pour avoir tenu des journées entières à me supporter devant le trieur et merci pour son riche enseignement de la cytométrie. Elle m'a donné goût et confiance en cette technique. Ca va me manquer ces journées entières dans le brouhaha du laser, le froid de la clim et le passage continuel des personnes qui utilisent la cytométrie. Mais ce lieu commun m'a fait rencontrer beaucoup d'amis.

*Merci à Anne-Frédérique Dessen et à Guillemet Huet pour leur investissement dans la collaboration pour l'étude de l'invasion. Merci également à Isabelle Wolowczuk pour son investissement dans les expériences *in vivo*.*

Merci à toute ma famille, qui bien que loin de mon travail, m'a écoutée et soutenue dans les moments difficiles mais a aussi partagé les joies de chaque étape de ma thèse.

Merci, merci à mon compagnon pour son soutien quotidien. Sa présence m'a été indispensable pour avancer sereinement lors de mon doctorat.

Liste des Abréviations	4
PARTIE I : INTRODUCTION.....	7
A] La peau humaine -----	8
I. La fonction, la structure et l'organisation de la peau.....	9
1. La fonction de la peau.....	9
2. La formation et structure de la peau.....	9
3. L'organisation de l'épiderme interfolliculaire	12
II. L'homéostasie, l'EPU et la différenciation	14
1. L'homéostasie.....	14
2. L'Epidermal Proliferative Unit (EPU).....	14
3. La différenciation.....	15
4. La différenciation et l'apoptose.....	18
III. Le cancer dans la peau humaine	23
B] Les cellules souches -----	26
I. La biologie des Cellules Souches normales (CS).....	27
1. Qu'est ce qu'une cellule souche ?	27
2. Quelles sont les propriétés des cellules souches ?.....	27
2.1. La quiescence.....	29
2.2. L'autorenouvellement et la division asymétrique.....	31
2.3. La multipotence et la différenciation	33
2.4. La plasticité des cellules souches adultes : modèle hiérarchisé /réversibilité	34
2.5. Peut-on induire la dédifférenciation et reprogrammer des cellules adultes?.....	35
3. La niche	36
4. Quels sont les marqueurs des CS ?	38
4.1. Les marqueurs liés à la mise en œuvre d'un test fonctionnel spécifique des propriétés propres aux cellules souches	39
4.1.1. <i>Le cycle cellulaire lent : Label Retaining Cells</i>	39
4.1.2. <i>La clonogénicité – CFU et la formation de sphères</i>	40
4.1.3. <i>L'exclusion de colorants vitaux : la « Side Population »</i>	40
4.1.4. <i>L'activité aldéhyde déshydrogénase</i>	42
4.1.5. <i>L'adhérence différentielle</i>	42
4.2. Les marqueurs moléculaires.....	43
4.2.1. <i>Les marqueurs généraux des cellules souches - « stemness »</i>	43
4.2.2. <i>Les marqueurs spécifiques des différents types de cellules souches (tissu spécifique)</i>	44
4.2.3. <i>La variabilité de l'expression des marqueurs avec l'état fonctionnel de la cellule souche..</i>	44
5. Le contrôle de la division et de la différenciation des cellules souches : l'exemple des cellules souches épidermiques (Figure 8)	45
5.1. La voie BMP et TGF	47
5.3. La voie Notch	47
5.4. La voie Wnt.....	49
5.5. La voie Sonic Hedgehog	50
5.6. c-Myc	51
5.7. Les intégrines	53
5.8. Rac 1	54
5.9. Les kinases dépendantes des cyclines (CDK)	54
6.10. Pten	55
5.11. FOXO	55
5.12. Hif1 α	55

II. Les cellules souches dans le cancer	57
1. La mise en évidence de l'existence des cellules souches tumorales...	58
2. Les difficultés de définition et de caractérisation des cellules souches tumorales	60
2.1. La définition.....	60
2.2. Les marqueurs	61
2.3. Les xénogreffes	61
2.4. L'abondance variable des cellules souches tumorales.....	61
3. La signification médicale des cellules souches tumorales	62
3.1. Les cellules souches tumorales comme marqueur pronostique	62
3.2. Les cellules souches comme cibles thérapeutiques	62
C] EGFR	64
I. Les récepteurs de la famille EGFR et ses ligands	65
1. La famille du récepteur EGFR.....	65
2. Les ligands de l'EGFR.....	66
3. L'activation de la voie de l'EGFR	66
II. Les cibles de l'EGFR et leurs voies de signalisation associées	68
1. Le rôle de l'EGFR au stade embryonnaire.....	68
2. La prolifération dépendante de la voie EGFR/MAPK.....	69
3. La balance entre la survie et l'apoptose dépend de la voie EGFR/PI3K	70
4. La différenciation kératinocytaire dépend-elle de l'EGFR ?	71
5. La régulation du cycle cellulaire par l'EGFR.....	72
6. Le rôle dans la migration et la réparation de la peau suite à une blessure.....	73
III. L'EGFR et le cancer	74
1. Les modifications de l'EGFR impliquées dans le cancer.....	75
2. Le traitement anti-EGFR.....	76
2.1. Les anticorps bloquant la conformation stabilisée du domaine extracellulaire.....	76
2.2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase du domaine intracellulaire	77
2.3. L'insuffisance dans les résultats obtenus en thérapie	77
PARTIE II : HYPOTHESES ET .OBJECTIFS DE THÈSE	79
PARTIE III : RESULTATS	82
A] Asymmetric Distribution of Epidermal Growth Factor Receptor Directs the Fate of Normal and Cancer Keratinocytes <i>in vitro</i>	83
B] Présentations de posters aux congrès	100
1. Des cellules souches à la mort cellulaire : Implication de la protéine adaptatrice p66 ^{Shc} dans le processus de différenciation des kératinocytes de la peau humaine	87
2. Epidermal Growth Factor Receptor distinguishes between stem and transient amplifying cell fate in squamous cell carcinoma cells line	102

3. Epidermal Growth Factor Receptor Distinguishes Between Stem and Transient Amplifying Cell Fate in a Squamous Cell Carcinoma Cell Line	103
PARTIE IV :DISCUSSION ET CONCLUSION	92
PARTIE V :AUTRES TRAVAUX	100
PARTIE VI :MATERIEL ET METHODES.....	105
1. CULTURE CELLULAIRE	106
1.1. Culture des cellules.....	106
1.2. Culture en condition de formation de sphères	106
1.3. Protocole de transfection.....	107
1.4. Différents traitements appliqués aux cellules.....	108
2. IMMUNOMARQUAGE	108
2.1. Préparation des échantillons.....	108
2.2. Protocole de marquage et de détection.....	109
3. WESTERN-BLOT	109
4. CYTOMETRIE DE FLUX	111
4.1. Phénotypage	111
4.2. Tri cellulaire.....	111
4.3. Cycle cellulaire.....	111
5. SUPERARRAYS.....	112
5.1. Extraction d'ARN (kit RNeasy Mini, Qiagen)	112
5.2. Technique de Superarrays (GEArray Q Serie (Bioscience)	112
PARTIE VII :REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .	114

Liste des Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AP1	Activator Protein 1
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
AREG	Amphireguline
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BH3	Bcl-2 homology domain 3
BMP	Bone Morphogenesis Protein
BrdU	BromodeoxyUridine
BTC	Betacelluline
CBC	Carcinome Baso Cellulaire
CD(95)	Cluster de Differentiation (95)
CDK	Cyclin Dependent Kinases, kinases dépendantes des kinases
CE	Carcinome Epidermoïde ou Carcinome SpinoCellulaire
Cellule ES	Cellules Souches Embryonnaires
Cellules d'AT	Cellules d'amplification transitoire
CldU	ChlorodeoxyUridine
CP	Cellules Progénitrices
CS	Cellule Souche
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
DIABLO	Direct IAP Binding protein with low pI
DICN	Domaine IntraCellulaire de Notch
DISC	Death Inducing Signaling Complex
Domaine CH1	Domaine Collagen Homologous Region A
Domaine PTB	Domaine PhosphoTyrosine Binding
Domaine SH2	Domaine Src Homology 2
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGF	Epidermal Growth Factor

EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPU	Epidermal Proliferative Unit ou Unité de Prolifération Epidermique
EREG	Epireguline
FAK	Focal Adhesion Kinases
FDA	Food and Drug Administration
GDP	Guanosine DiPhosphate
GTPase	Guanosine TriPhosphatase
HBEGF	Heparine Binding EGF
HER	Human Epidermal Receptor
Hes1	Hairy and Enhancer of Split1
HIF	Hypoxia Inducing Factor
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HSC	Hematopoietic Stem Cell ou Cellule Souche Hématopoïétique
IAP	Inhibitor Apoptosis Proteins
IdU	IododeoxyUridine
IGF	Insulin Growth Factor
IKK	IkappaB Kinase
K1	Kératine 1
K5	Kératine 5
K8	Kératine 8
K9	Kératine 9
K10	Kératine 10
K14	Kératine 14
K20	Kératine 20
LRC	Label Retaining Cells
LT-HSC	Long Term HSC
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MDR	MultiDrug Resistance
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MMP	Métalloprotéinases Matricielles
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NADH	Nicotinamide Adénine DiNucléotide

NGR	Neureguline
NOD/SCID	Non Obese Diabetic / Severe Combined ImmunoDeficiency
NSCLC	Non Small Cell Lung Carcinoma ou carcinome du poumon à non petites cellules
PGC1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α
PI3K	PhosphoInositol 3 Kinase
PKC	Protein Kinase C
PLC	PhosphoLipase C
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
ROS	Reactive Oxygen Species ou Espèces réactives de l'oxygène
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
SOS	Son of Sevenless
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF beta	Transforming Growth Factor beta
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TPA	12-O-TétradécanoylPhorbol-13-Acétate
Transporteurs ABC	Transporteurs ATP-Binding Cassette
UVB	Ultra-violet B
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

PARTIE I :

INTRODUCTION

A] La peau humaine

I. La fonction, la structure et l'organisation de la peau

1. La fonction de la peau

Avec une surface d'environ 2m², la peau et ses appendices forment l'organe le plus important du corps humain (16% du poids corporel). Son épaisseur varie entre quelques dizaines de microns (au niveau des paupières) et 3 mm environ (au niveau de la plante des pieds) (Wysocki AB, Nurs.Clin.North Am., 1999). La peau isole le corps de l'environnement et constitue une barrière de protection contre les agressions de l'environnement extérieur (les infections, les radiations, les traumatismes). La peau forme aussi une barrière étanche contre la sortie des fluides indispensables au corps notamment l'eau (Fuchs E, Nature, 2007). C'est un organe sensoriel majeur, impliqué dans la perception du toucher et la régulation des changements de température corporelle. Elle fonctionne aussi comme un système immunitaire et un producteur de Vitamine D3 et d'acide folique B.

2. La formation et structure de la peau

La peau est une structure hétérogène dans laquelle se trouvent des cellules épithéliales et immunitaires, mais également des cellules conjonctives, musculaires, vasculaires et nerveuses. Elle est divisée en trois couches superposées : l'hypoderme au fond, le derme au milieu et l'épiderme à la surface (Figure 1).

L'hypoderme est une couche adipeuse impliquée dans l'isolation thermique et la protection mécanique.

Le derme, dérivé du mésoderme, est un tissu conjonctif dense, fibreux et élastique qui repose sur l'hypoderme. Il est constitué majoritairement de fibroblastes d'origine mésenchymateuse et d'une matrice fibro-élastique de collagène et d'élastine. Il confère de la souplesse et de l'élasticité à la peau et constitue un support pour les différentes annexes cutanées dérivées de l'épiderme. Il contient de

nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques favorisant de nombreux échanges nutritifs avec l'épiderme. Il est également riche en cellules immunitaires de type macrophages et cellules dendritiques, qui jouent un rôle dans la défense immunitaire de la peau. Il intervient dans les mécanismes de cicatrisation, de régulation de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes en synthétisant des cytokines et des facteurs de croissance solubles se diffusant dans l'épiderme.

Le derme est séparé de l'épiderme par une structure en feuillet appelée membrane basale, riche en matrice extracellulaire (MEC) et en facteurs de croissance maintenant la cohésion dermo-épidermique. Cette membrane forme une matrice d'ancrage pour les cellules de la couche basale de l'épiderme et permet, entre autre la diffusion des nutriments.

L'épiderme, issu de la couche ectodermique embryonnaire, est un épithélium pavimenteux (cellules plates en forme de pavage), kératinisé, dont la stratification est initiée par des signaux transmis par les cellules mésenchymateuses lors de la gastrulation. Il forme des crêtes se projetant dans le derme. L'ensemble de l'épiderme fait en moyenne 100µm mais peut varier entre 50µm et 1mm selon sa localisation.

Les cellules rencontrées dans l'épiderme sont majoritairement des kératinocytes (environ 85%). On trouve également des mélanocytes, issus des crêtes neurales, responsables de la pigmentation de la peau et de la protection contre les radiations ultra-violettes ; les cellules de Langerhans, sentinelles du système immunitaire local et les cellules de Merkel, intervenant dans la perception sensorielle. L'épiderme ne contient aucun vaisseau sanguin ni lymphatique, mais renferme de nombreuses terminaisons nerveuses, issues des crêtes neurales.

Il est constitué d'un épiderme interfolliculaire et d'annexes structurelles comme les follicules pileux, les glandes sudoripares et sébacées (Blanpain C et Fuchs E, *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 2006 ; Blanpain C et Fuchs E, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 2009) (Figure 1).

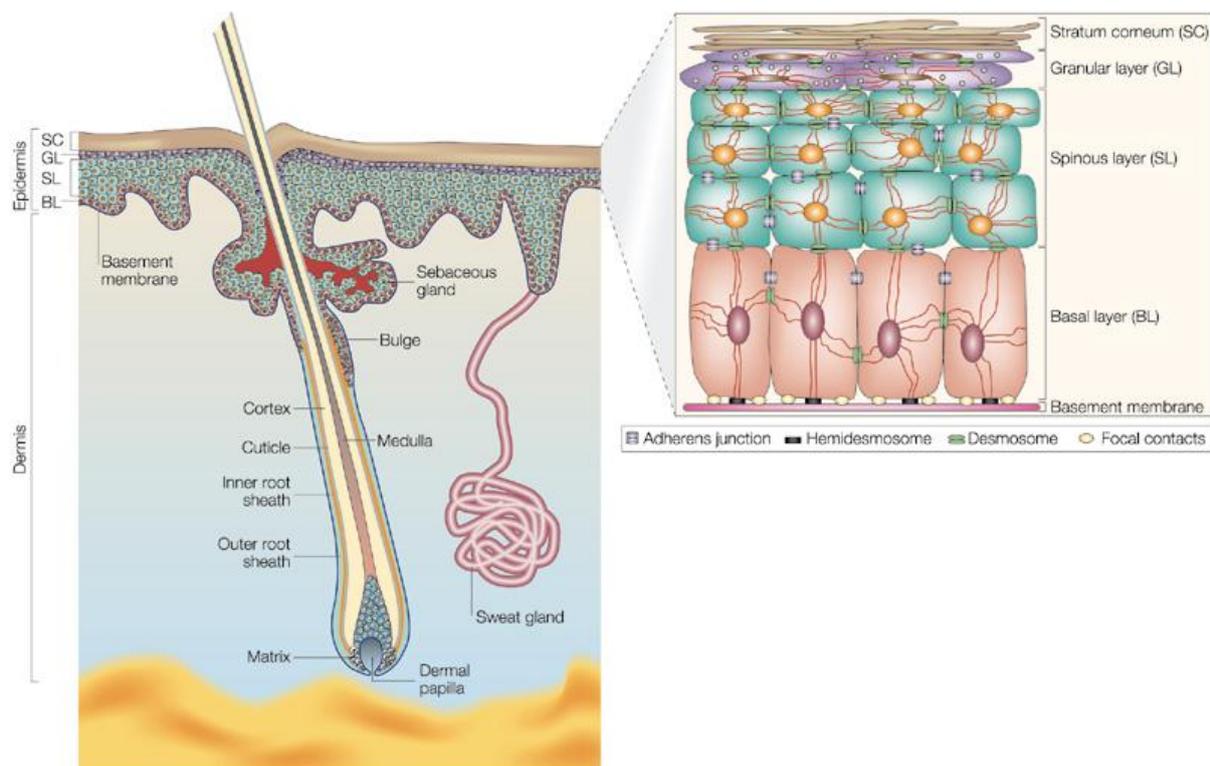


Figure 1 : Description de la peau. On trouve l'hypoderme, le derme et l'épiderme. Ce dernier est composé de l'épiderme interfolliculaire, de follicule pileux, de glandes sébacées et sudoripares. L'épiderme est divisé en 4 couches : basale, épineuse, granuleuse et cornée. *D'après Fuchs & Raghavan, Nature Reviews Genetics 2002.*

Les poils sont implantés obliquement dans le derme par invagination de l'épiderme. Ils possèdent des terminaisons libres de fibres nerveuses, adaptées notamment pour la perception de la douleur et les changements de température. Ils protègent également l'épiderme des frottements et des irritations.

Les glandes sébacées, associées aux poils, sécrètent du sébum qui lubrifie et imperméabilise l'épiderme.

Les glandes sudoripares, ancrées au niveau du derme profond, sécrètent la sueur allant jusqu'à la surface de la peau et en s'évaporant réduit la température corporelle.

3. L'organisation de l'épiderme interfolliculaire

L'épiderme se renouvelle en permanence. Des couches les plus profondes jusqu'à la surface, les kératinocytes, cellules qui le composent majoritairement, subissent des changements morphologiques en continu. On distingue 4 couches superposées composant l'épiderme interfolliculaire (couramment appelé épiderme) : la couche basale, épineuse, granuleuse puis cornée (Figure 1).

Les kératinocytes naissent au niveau de la couche basale. Cette couche est composée d'une seule assise de cellules indifférenciées, reconnaissables par un nucléole volumineux et une forme cubique ou prismatique. Leur cytoplasme est riche en organites (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries, lysosomes, endosomes, peroxyosomes). Les cellules sont très serrées et possèdent beaucoup de protéines du cytosquelette comme des microtubules et des microfilaments d'actines ainsi que de nombreux filaments de kératines, d'où leur nom de kératinocytes. Ces protéines jouent un rôle important dans la cohésion de la couche basale avec la membrane basale, d'une part et entre les cellules, d'autre part. La première liaison se fait par des contacts focaux alors que les cellules sont liées les unes aux autres par des desmosomes liés aux kératines.

La couche basale constitue le compartiment prolifératif où les cellules sont en phase de prolifération limitée (4-5 divisions). Puis les cellules s'arrêtent dans leur cycle cellulaire, se détachent de la membrane basale et s'éloignent du derme pour migrer vers les couches suprabasales et entrer en phase de différenciation.

Dans la couche épineuse, composée de 4 à 8 assises, les cellules sont polyédriques. Leur taille augmente, elles s'aplatissent et le rapport entre le cytoplasme et le noyau diminue en comparaison aux cellules basales. Leurs noyaux sont vésiculeux et contiennent des nucléoles bien visibles. Bien que leur activité mitotique soit perdue, elles ont encore une batterie d'organites fonctionnels et témoignent d'une activité de phagocytose accrue. Les corps étrangers sont dégradés par les enzymes lysosomales ou conservés dans les phagosomes, puis éliminés lors de la desquamation. Les cellules sont reliées entre elles par de nombreux desmosomes, leur conférant un aspect épineux d'où le nom de cette couche. Les microfilaments sont plus abondants que dans la couche basale et mieux organisés

en faisceaux autour du noyau. Ils s'attachent aux desmosomes procurant ainsi une grande résistance à l'abrasion.

La couche granuleuse est composée de cellules aplaties et étirées qui s'alignent parallèlement à la surface de la peau. Certains anatomistes divisent cette couche en deux avec une couche supplémentaire entre la couche granuleuse et la couche cornée, appelée couche lamellaire. Les organites y sont ovoïdes avec des corps lamellaires issus des vésicules golgiennes contenant des hydrolases et un empilement de feuilletés lipidiques. Les noyaux des cellules sont en dégénérescence, mais toujours actifs. C'est la dernière couche nucléée de l'épiderme. Dans cette couche a lieu la transformation de kératinocytes vivants en cornéocytes morts, mais fonctionnels, caractéristique majeure de la différenciation kératinocytaire.

La couche cornée est une couche très importante de la peau, car elle constitue une barrière imperméable, protection vitale de la peau. Elle est composée de 25 à 30 rangées de cornéocytes, cellules mortes hexagonales, très aplaties. Bien que les organites de ces cellules soient détruits, de nombreux processus biochimiques ont lieu, notamment grâce à la présence de nombreux corps lysosomaux. Cette couche est hautement résistante à des changements de pH ou l'action d'enzymes. Les cellules les plus superficielles sont éliminées de la surface par desquamation et remplacées par d'autres kératinocytes engagés dans la différenciation. La génération de cornéocytes est un processus continu qui débute dans la couche basale avec la naissance de nouveaux kératinocytes aussi vite que les cornéocytes les plus vieux sont éliminés dans l'environnement.

II. L'homéostasie, l'EPU et la différenciation

1. L'homéostasie

L'épiderme est un tissu en renouvellement constant (renouvellement intégral tous les 28 jours). Le nombre de cellules naissantes est en balance avec le nombre de cellules qui se différencient et sont éliminées par desquamation. Ce phénomène est finement contrôlé et porte le nom d'homéostasie tissulaire, cruciale pour le maintien du tissu adulte. L'équilibre est possible grâce à la présence des cellules souches (CS) et de leur division asymétrique. Les mécanismes *in vivo* régulant l'homéostasie sont encore mal connus, même s'il a été observé que toute perturbation du processus peut engendrer diverses pathologies cutanées.

2. L'Epidermal Proliferative Unit (EPU)

En 1974, Potten montre que l'épiderme est organisé en unités de prolifération épidermique (EPU) ([revue de Potten CS, J.Invest.Dermatol.Symp.Proc., 2004](#)). Ces structures stables et constantes, composées d'un empilement régulier de cellules, sont organisées de la couche basale à la couche cornée ([Parkinson EK, Semin.Cell Biol., 1992](#) ; [Mackenzie IC, J Invest Dermatol., 1997](#)). Cette hiérarchie des cellules épidermiques existant à la fois chez les souris et l'Homme a été confirmée dans plusieurs laboratoires en suivant la migration de cellules génétiquement modifiées exprimant le produit du gène LacZ, la β -galactosidase observable en bleu ([Garlick JA and Taichman LB, J Dermatol., 1992](#)) ([Figure 2](#)).

Au niveau de la couche basale, la division occasionnelle des cellules se divisant lentement, appelée cellules souches épidermiques, est contrôlée par un ensemble de facteurs que nous détaillerons dans le chapitre suivant de la thèse. Lors de cette division, asymétrique et latérale, une dizaine de kératinocytes basaux est produite, formant une base hexagonale autour de la cellule centrale. Ces cellules, appelées cellules d'amplification transitoire, se divisent ensuite verticalement et se

différencient en migrant dans les couches suprabasales, en colonne bien définies et prédéterminées par l'organisation de la couche basale.

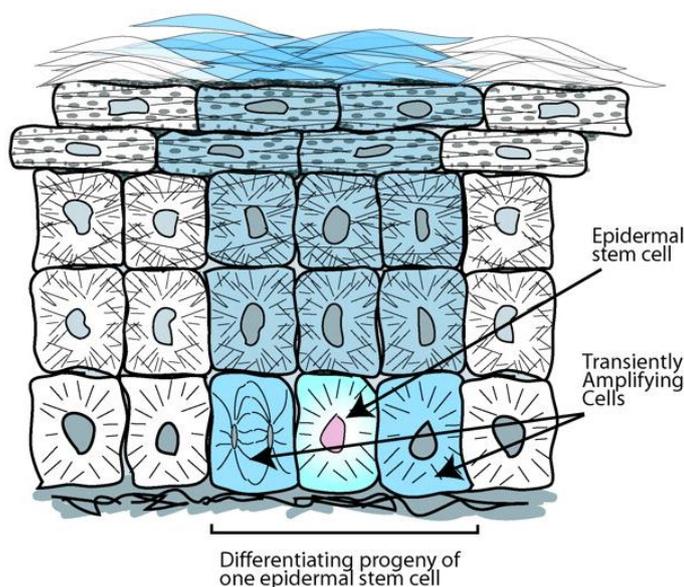


Figure 2 : La peau est divisée en unités de prolifération épidermique (EPU).
D'après Alonso et Fuchs, PNAS, 2003.

Le développement de l'épiderme serait donc gouverné par un ensemble de cellules se divisant occasionnellement pour former une structure bien définie hiérarchisant l'épiderme en unités bien encadrées (Jones PH *et al.*, Cell Stem Cell, 2007).

3. La différenciation

Les cellules souches sont multipotentes et capables de se différencier pour former les kératinocytes de l'épiderme interfolliculaire mais aussi les cellules des différents appendices de cet épiderme. Dans la peau normale, l'homéostasie définie du lignage des cellules souches de l'EPU permet le renouvellement continu de tous les kératinocytes subissant la différenciation terminale pour former l'épiderme mature.

L'épiderme est un modèle idéal pour étudier la différenciation et ses médiateurs moléculaires, du à son architecture unique où chaque couche correspond

à un stade de différenciation cellulaire. Cette différenciation débute lorsque les cellules d'amplification transitoire, produites suite à la division asymétrique des cellules souches, se détachent de la membrane basale, subissent quelques divisions puis arrêtent leur cycle cellulaire et leur activité mitotique pour entrer dans la phase de différenciation. Le processus de différenciation suit la migration des cellules d'amplification transitoire à travers les différentes couches suprabasales de l'épiderme jusqu'à la surface.

En culture, l'augmentation de la concentration en calcium, les esters de phorbol (TPA), l'interféron γ , la vitamine D3, la culture en suspension ou encore la confluence des cellules sont autant d'acteurs intervenant dans l'arrêt de la prolifération cellulaire et entraînant la différenciation kératinocytaire (Jetten AM et Harvat BL, *J.Dermatol*, 1997). La progression du cycle cellulaire est sous le contrôle des kinases cyclines dépendantes (CDK) avec une augmentation, dans les cellules différenciées, du taux d'inhibiteurs de ces kinases comme p21^{WAF/CIP1}, p27^{KIP1} et p16 (Dotto GP, *Biochim.Biophys.Acta*, 2000). L'arrêt de la prolifération serait donc nécessaire à l'induction de la différenciation, mais pas suffisant. En effet, le traitement des cellules avec du TGF β induit l'arrêt du cycle cellulaire sans induire l'expression des marqueurs de différenciation.

Les cellules des différentes couches épidermiques expriment différentes protéines du cytosquelette (Figure 3), caractérisant le niveau de différenciation. Les kératinocytes épidermiques indifférenciés expriment les kératines de type I légères et acides telle que K5 et des kératines de type II (lourdes et basiques) comme K14, utilisées comme marqueurs du compartiment prolifératif.

Les cellules différenciées de la couche épineuse expriment les protéines de soutien kératines K1 (type II) et K10 (type I) se connectant aux desmosomes et n'exprimant plus les cytokératines K14 et K5 (Jetten AM et Harvat BL, *J.Dermatol.*, 1997 ; Blanpain C et Fuchs E, *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 2006). Les kératines K1 et K10 forment un réseau de filaments intermédiaires robuste reliant deux cellules via leur association aux desmosomes dont les plaques formées de protéines de soutien, les Cadhérines, rapprochent deux cellules voisines et permettent la cohésion de l'épiderme.

Au niveau de la couche granuleuse, la différenciation est caractérisée par l'expression de profilaggrine remplissant des granules de kératohyalines. La

profilaggrine est transformée en filaggrine mature qui agrège les kératines en une structure résistante au stress.

D'autres protéines spécifiques de la différenciation, la loricrine et l'involucrine sont regroupées dans une enveloppe cellulaire cornée par des transglutaminases 1 et 3. Ciblée par l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, la formation de l'enveloppe cellulaire débute déjà dans la couche épineuse. Localisée sous la membrane plasmique, cette structure insoluble spécifique des kératinocytes assure la résistance cellulaire aux étirements mécaniques des kératinocytes différenciés. La couche cornée, quand à elle est reconnaissable par la présence de lipides extracellulaires hautement organisés (Elias PM, *Semin.Immuno Pathol*, 2007). Le détachement des cornéocytes morts à la surface épidermique achève la maturation des kératinocytes.

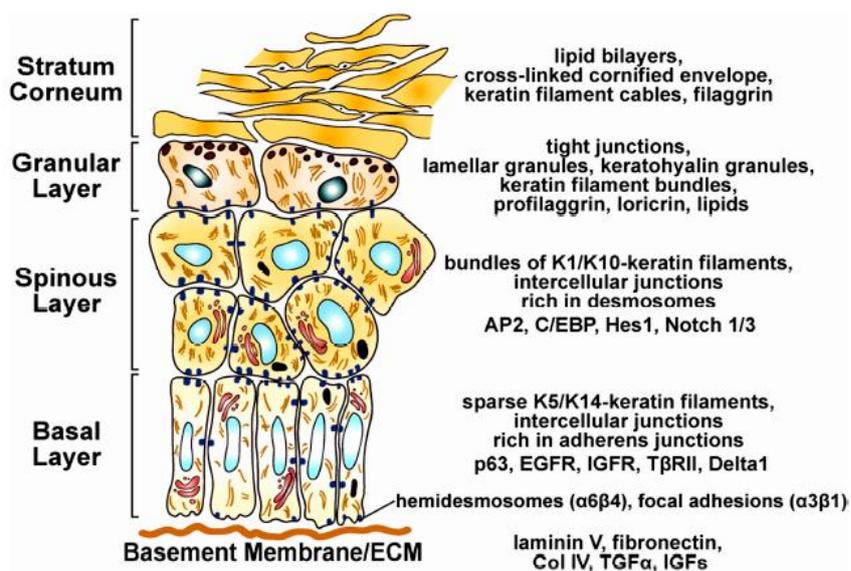


Figure 3 : La différenciation épidermique. Chaque étape de la différenciation est caractérisée par de nombreux marqueurs spécifiques de chaque couche de l'épiderme. *Fuchs E, J Cell Biol., 2008.*

Plusieurs voies développementales sont importantes pour le maintien des cellules souches épidermiques et leur différenciation. Par exemple, la protéine p63, membre de la famille p53, est impliquée dans les différentes étapes du développement et de la différenciation épidermique. Cette protéine, considérée comme marqueur de cellules souches épidermiques semble être impliquée dans les

premières étapes du développement embryonnaire. Les souris p63^{-/-} ne développent pas d'épiderme stratifié et d'annexes cutanées, soit parce que les cellules souches perdent leur capacité d'auto-renouvellement ou parce que les cellules meurent prématurément (Koster MI *et al.*, *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.*, 2002 ; McKeon F, *Genes Dev.*, 2004). La monocouche résultante n'exprime pas les marqueurs de différenciation tels que K1, l'involucrine ou la filaggrine.

La différenciation des kératinocytes peut également être induite par IKK α . Ainsi, la délétion d'IKK α dans les kératinocytes induit le développement d'un épiderme affiné chez les souris (Liu B *et al.*, *Cancer Cell*, 2008).

Ces données montrées pour p63 et IKK α signalent une interrelation entre les voies de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire qui, apparemment différentes, utilisent des médiateurs moléculaires communs.

4. La différenciation et l'apoptose

L'interconnexion moléculaire entre la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire, a été suggérée suite à l'observation que les kératinocytes, subissant la différenciation terminale, expriment en même temps des protéines impliquées dans l'apoptose. Ceci a abouti en 1993, au concept de mort cellulaire par différenciation dans la peau (Haake AR and Polakowska RR, *J Invest Dermatol.*, 1993). En 1994, ce concept s'explique par le fait que la voie apoptotique comme la voie de la différenciation terminale éliminent les cellules en excès que ce soit lors du développement embryonnaire ou dans les tissus adultes qui se renouvellent en permanence (Polakowska RR and Haake AR, *Cell Death Diff.*, 1994) (Figure 4). Il a également été montré que des marqueurs jusqu'alors associés à l'apoptose comme la condensation de la chromatine (Karasek J *et al.*, *Br.J.Dermatol.*, 1972) ou la fragmentation de l'ADN (McCall CA et Cohen JJ., *J.Invest.Dematol.*, 1991) interviennent lorsque la différenciation terminale est stimulée. Il existe donc une similarité de machinerie pour l'apoptose et pour la différenciation terminale des kératinocytes qui constituent toutes deux des voies de mort cellulaire.

L'apoptose est une voie de mort cellulaire programmée. Elle a été décrite en 1972 par John Kerr, Andrew Wyllie et Alastair Curie ([Kerr JF et al., Br J Cancer, 1972](#)). Elle prend comme modèle la chute des feuilles et peut être définie comme un suicide cellulaire génétiquement programmé. Elle intervient dans l'homéostasie tissulaire en régulant l'élimination des cellules pour maintenir l'équilibre par rapport au nombre de cellules naissantes tout au long du processus du développement embryonnaire ainsi que dans les tissus adultes.

L'apoptose est caractérisée par la condensation de la chromatine, ensuite dégradée en un profil caractéristique dit en « barreau d'échelle », mis en évidence par électrophorèse. La membrane plasmique reste intacte mais au niveau du cytoplasme, se forment des corps apoptotiques renfermant les organites, les fragments de noyau et de cytosol. Ces corps exposent à leur surface des résidus de phosphatidylsérine, reconnus et ingérés par les macrophages ou les cellules voisines. Les cellules qui subissent l'apoptose ou la différenciation présentent des réarrangements du cytosquelette comparables, des événements de fission et de fusion de la membrane tout comme des altérations similaires de la chromatine et de l'architecture nucléaire ([Fernando P et Medeney LA, FASEB J., 2007](#)).

Deux voies conduisent à la mort cellulaire programmée : une voie extrinsèque dépendante des récepteurs de mort et une voie intrinsèque dépendante de la mitochondrie.

La voie extrinsèque est initiée par l'activation des récepteurs de la superfamille du TNFR se trimérisant et formant le DISC (Death-Inducing signaling complex) avec FADD et la caspase 8 ou 10. Une fois actives, ces caspases initiateuses activent les caspases effectrices, comme la caspase 3, qui clivent leur substrat aboutissant à la mort cellulaire. Parmi les récepteurs de la famille TNFR on trouve Fas (CD95), impliqué dans l'apoptose des cellules mais aussi dans la différenciation à des niveaux d'exposition aux UVB différents ([Mammone T et al., Cell Biol.Toxicol., 2000](#)). Le récepteur à l'EGF est également important puisqu'il intervient dans l'apoptose et dans la différenciation des kératinocytes ([Alexandrescu DT et al., Dermatol Online J., 2009](#)).

L'autre voie apoptotique, intrinsèque, est activée en réponse à des dommages à l'ADN, à des défauts dans le cycle cellulaire, à des conditions d'hypoxie ou suite à

d'autres stress environnementaux (Wang X *et al.*, *J.Biol. Cell*, 2003). Cette voie passe par des modifications cellulaires et moléculaires au niveau de la mitochondrie (perméabilisation de la membrane externe, réduction du potentiel de membrane mitochondriale, découplage de la chaîne respiratoire et production d'espèces réactives de l'oxygène). Ces modifications sont régulées par les protéines de la famille Bcl2, composée d'un ensemble de facteurs BH3-like plutôt pro-apoptotiques comme Bad, Bid, Bik, Bim, Noxa, Puma, Bax, Bak, Bok et de facteurs anti-apoptotiques comme Bcl2, Mcl-1 et Bcl_{xL}. L'activation des protéines pro-apoptotiques au niveau de la mitochondrie induit le relargage dans le cytoplasme de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c, SMAC/DIABLO ou AIF (Apoptosis Inducing Factor). SMAC/DIABLO se lie aux IAP (Inhibitor Apoptosis Proteins) pour les inhiber. Le cytochrome c lui, se lie à Apaf-1 pour former l'apoptosome qui va activer la caspase initiateur 9. S'ensuit, la cascade des caspases, conduisant à la mort des cellules via l'activation d'endonucléases et à la fragmentation de l'ADN (Enari M *et al.*, *Nature*, 1998). Le relargage d'AIF ou de l'endonucléase G dans le noyau stimule la condensation de l'ADN et sa fragmentation sans l'implication de l'apoptosome (Degterev A *et Yuan J*, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008).

Les deux voies apoptotiques communiquent entre elles puisque la caspase 8 clive le facteur pro-apoptotique Bid, alors transloqué à la mitochondrie où il induit la libération du cytochrome c qui interagit avec Bax et Bak pour conduire à la mort cellulaire (Green DR *et Beere HM*, *Nature*, 2000). D'autre part, les facteurs de la voie intrinsèque sensibilisent les cellules à la voie extrinsèque.

La mitochondrie joue un rôle central dans l'apoptose tout comme dans la différenciation des kératinocytes. En 2003, notre équipe a montré que l'induction de la différenciation des kératinocytes conduit à une diminution du potentiel membranaire mitochondrial et à la libération du cytochrome c comme après l'induction de l'apoptose de ces cellules. Néanmoins, dans l'apoptose toutes les mitochondries excluent le cytochrome c alors que dans la différenciation le processus est graduel. Cela suggère que la différenciation passe par la libération du cytochrome c jusqu'à un point de rupture enclenchant la libération d'autres facteurs, comme AIF, qui activent la cascade des caspases et mènent à la mort cellulaire (Allombert-Blaise C *et al.*, *Cell Death Diff.*, 2003). De plus, Susan Tamiji *et al.* ont décrit l'importance du stress oxydatif et des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

dans l'apoptose et la différenciation des kératinocytes (Tamiji S *et al.*, *J.Invest.Dermatol.*, 2005). A faible taux, les ROS stimulent la prolifération et la différenciation. Si la concentration augmente ceci conduit à l'induction de l'apoptose (Droge W, *Physiol Rev.*, 2002). La production des ROS conduit à l'augmentation de la masse mitochondriale, la libération d'AIF et du cytochrome c, responsables de l'induction de l'expression de la kératine 10. La différenciation comme l'apoptose sont dépendantes de la capacité de Bcl2 à contrôler les ROS intracellulaires. La balance entre la différenciation et l'apoptose des cellules dépend de la quantité des ROS dans ces cellules.

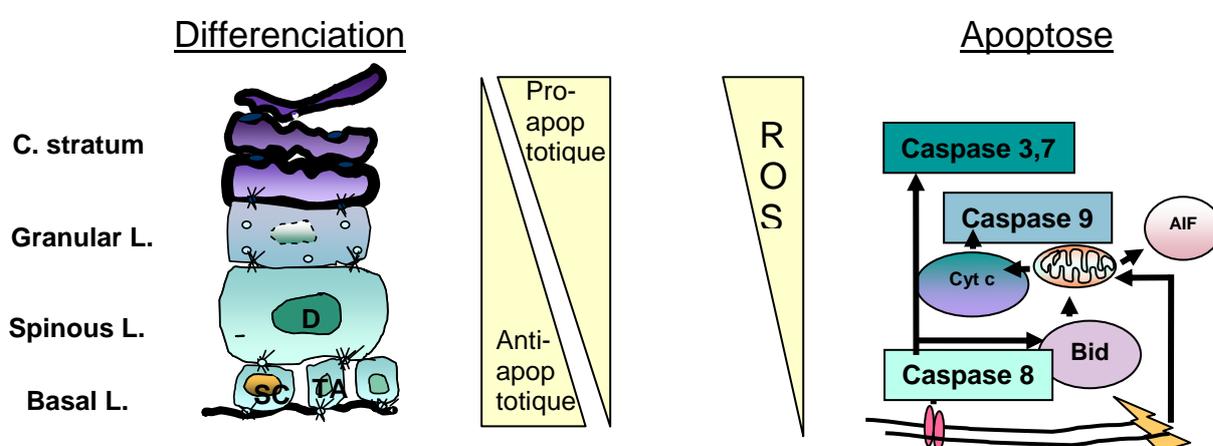


Figure 4 : Comparaison des facteurs impliqués dans la différenciation et l'apoptose au sein de l'épiderme. La différenciation et l'apoptose sont deux voies de mort cellulaire dont les caractéristiques ont des éléments communs comme le cytochrome c ou la production de ROS.
D'après Tamiji, 2005.

L'initiation de l'activité des caspases coïncide avec les stades précoces de différenciation des cellules souches embryonnaires (Fujita J *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2008) et des cellules souches hématopoïétiques (Janzen V *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2008).

Le facteur de transcription de la famille Forkhead, FOXO3A est aussi un bon régulateur de l'apoptose puisqu'il est capable de réguler le facteur pro-apoptotique Bad. Il intervient aussi dans la différenciation car lorsqu'il est phosphorylé il est transloqué du noyau au cytoplasme et n'agit plus sur la survie cellulaire.

Les familles de protéines impliquées dans l'apoptose et la différenciation sont les mêmes : caspases, p53, calpaines, cathepsine, transglutaminases mais les partenaires de ces familles sont différents dans les deux voies. Par exemple, p53 joue un rôle dans l'apoptose alors que dans la différenciation c'est son partenaire p63.

En conclusion, il existe une balance permanente entre l'expression de marqueurs stimulant ou inhibant la mort cellulaire. Ceci caractérise le processus progressif de différenciation qui aboutit finalement à l'induction de la mort cellulaire.

Toutes ces données présentent des perspectives très intéressantes quand à la compréhension de la différenciation, l'apoptose et leur dérèglement dans le cancer. Il reste cependant des points à éclaircir puisque des controverses existent encore entre différentes équipes. Lippens et al. ont montré qu'il existait des différences entre l'apoptose et la différenciation des kératinocytes ([Lippens S et al., Cell Death.Differ., 2005](#)). Mais le concept de mort cellulaire par différenciation n'est pas restreint à l'épiderme puisque il a été décrit également dans les cellules du cristallin par exemple ([Weber GF et Menko AS, J.Biol Chem, 2005](#)).

III. Le cancer dans la peau humaine

Le cancer de la peau touche de plus en plus de personnes en France et en Europe. On observe une augmentation de 5 à 7% par an en Europe. En France, 50 000 carcinomes et 7 000 nouveaux cas de mélanomes sont diagnostiqués par an. Dans les pays où la population est blanche une augmentation par 2 du nombre de cancers de la peau entre 2000 et 2015 a été estimée par l'ONU. On pense également que 50% des personnes de plus de 65 ans auront au moins un cancer de la peau au cours de leur vie.

Le cancer de la peau a plusieurs origines cellulaires. Les carcinomes représentent 90% des cancers de la peau et les mélanomes environ 10%.

Le carcinome basocellulaire se situe au niveau de la couche basale de l'épiderme. C'est le carcinome le plus fréquent mais le moins agressif car il n'est pas métastatique. C'est le plus facilement guérissable. Il se caractérise par l'apparition d'une tâche blanchâtre sur une partie du corps généralement plus exposée au soleil (visage, bras, mains...) ou sous forme d'un ulcère qui ne guérit pas (Figure 5A et B).

Le carcinome spinocellulaire peut donner de rares métastases (1% environ) au niveau des ganglions lymphatiques proches de la tumeur. Il se présente sous forme d'une lésion en relief aux bords irréguliers. Ces deux carcinomes progressent lentement, ils ne sont pas mortels, touchent les plus de 50 ans. Le fait qu'ils ne soient ni douloureux, ne saignant pas et n'entraînant pas de démangeaison reculent la consultation chez le médecin et leur traitement (Figure 5C et D).

Il existe aussi des types de cancer de la peau minoritaires comme le carcinome à cellules de Merkel, le carcinome des glandes sébacées et sudoripares, les sarcomes ou les lymphomes.

Un autre type de cancer de la peau est le mélanome issu des mélanocytes (cellules qui produisent la mélanine) et se situant à la jonction entre le derme et l'épiderme. Le mélanome touche des sujets plus jeunes que les carcinomes. Ces tumeurs sont fortement métastatiques donc plus difficile à traiter. Il existe 4-5% de facteurs génétiques pour le développement de mélanome. Le mélanome se caractérise par une tâche noirâtre ou un grain de beauté qui grossit, devient irrégulier, se décolore au centre. Les mélanomes sont responsables de 75% des décès causés par le cancer de la peau (Figure 5E et F).

La principale cause de développement du cancer de la peau est le soleil.

Plusieurs techniques sont utilisées pour traiter le cancer de la peau.

La plus simple est la simple exérèse ainsi que l'extraction des ganglions lymphatiques pour le carcinome spinocellulaire et le mélanome. Si la tumeur est trop volumineuse l'exérèse peut être accompagnée de greffe de peau. La cryochirurgie avec de l'azote liquide brûlant les lésions précancéreuses est aussi utilisée sur des petites tumeurs. Pour traiter les mélanomes d'une certaine épaisseur les médecins ont recours à la chimiothérapie mais le taux de réponse est insuffisant. Donc ils utilisent l'immunothérapie qui permet l'activation des cellules du système immunitaire (les lymphocytes T) qui vont attaquer les cellules tumorales. C'est le cas avec l'administration d'interféron ou d'interleukine 2. Pour les carcinomes il est aussi courant d'utiliser la radiothérapie.

Ainsi, plus le cancer est localisé et pris de bonne heure plus le pronostic sera bon mais devant l'augmentation permanente de cas il est important de trouver l'origine du cancer pour mieux cibler les cellules cancéreuses.

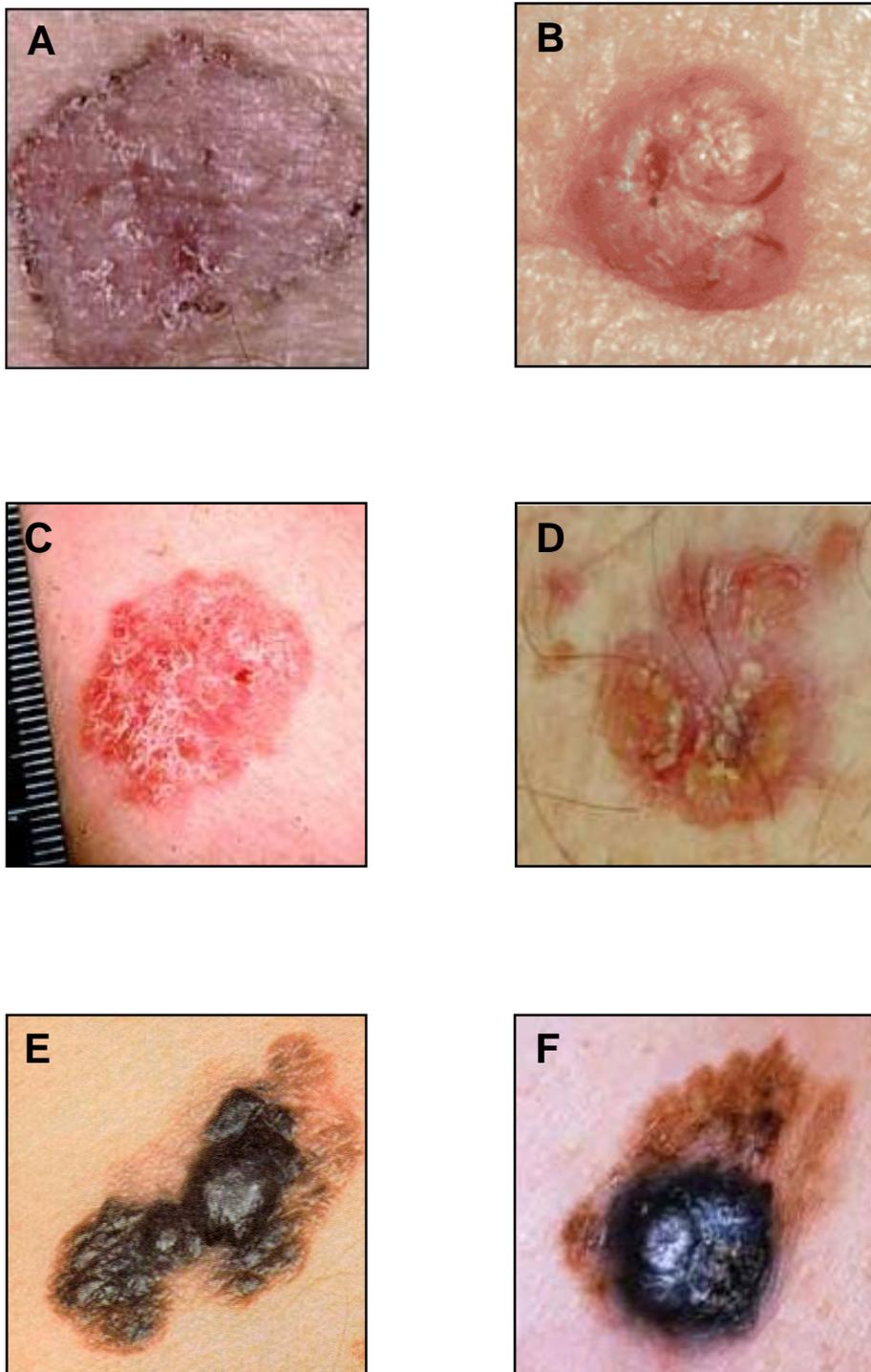


Figure 5 : Photographies de tumeurs de peau

A et B photographies de carcinomes basocellulaires
C et D photographies de carcinomes spinocellulaires
E et F photographies de mélanomes

B] Les cellules souches

Dans ce chapitre, nous aborderons successivement la biologie des cellules souches puis le concept novateur des cellules souches tumorales, ouvrant des perspectives fascinantes en cancérologie.

I. La biologie des Cellules Souches normales (CS)

L'intérêt pour les cellules souches dans le monde de la recherche débuta dans les années 1960 avec les scientifiques canadiens Ernest A. McCulloch et James E. Till. Ils ont injecté à des souris des cellules hématopoïétiques murines qui ont donné des colonies en culture et se sont différenciées en trois types cellulaires ([Becker AJ et al., Nature, 1963](#)).

1. Qu'est ce qu'une cellule souche ?

Une cellule souche (CS) est définie comme une cellule capable de donner naissance à différents types de cellules spécialisées par divisions successives. Les différents types de cellules souches rencontrées au cours du développement et chez l'adulte sont à l'origine de toutes les cellules de l'organisme et permettent le renouvellement de certains tissus chez l'adulte.

2. Quelles sont les propriétés des cellules souches ?

Les cellules souches adultes ont la capacité de s'autorenouveler et de se différencier en différents types cellulaires et présentent un potentiel de prolifération élevé (nombre de divisions possibles très important). Elles se divisent rarement et restent la plupart du temps quiescentes et indifférenciées ([Cai J et al., Exp.Hematol., 2004](#)). Leur division asymétrique produit deux cellules différentes. La première est une cellule souche, qui permet le maintien d'un nombre constant de cellules souches. La seconde est une cellule d'amplification transitoire (AT) qui se divise de façon limitée sur une courte période puis entre dans le processus de différenciation terminale spécifique du tissu dans lequel elle se trouve et finit par mourir ([Figure 6](#)).

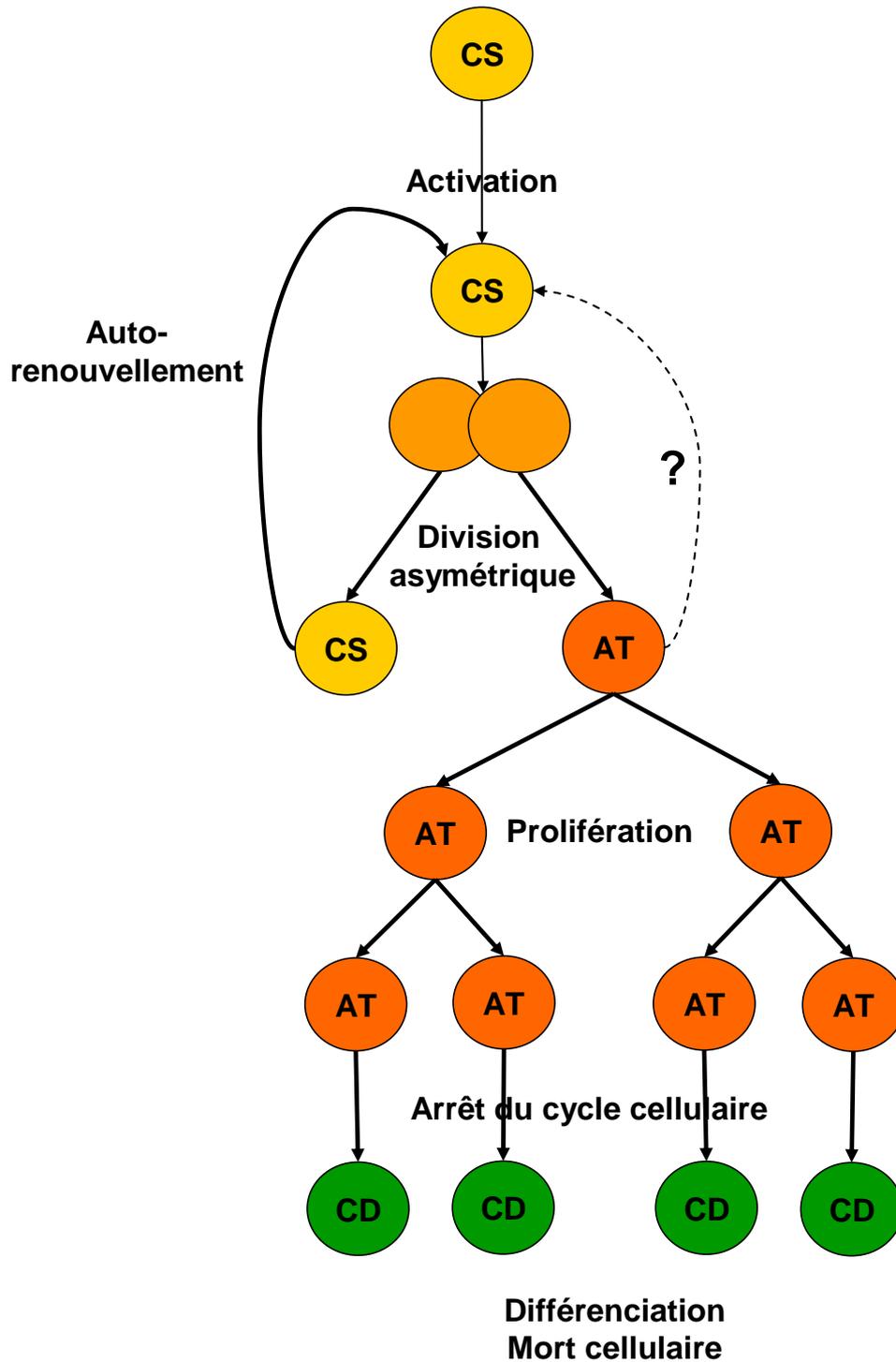


Figure 6 : Schéma de renouvellement de l'épiderme de la division des cellules souches à la différenciation terminale des cellules d'amplification transitoire. Les cellules souches (CS) se divisent asymétriquement pour s'auto-renouveler et former une cellule d'amplification transitoire qui se divise symétriquement. L'arrêt du cycle cellulaire précède la phase de différenciation et de mort cellulaire.

Les cellules souches peuvent aussi augmenter leur nombre par division symétrique classique, donnant naissance à deux cellules filles possédant le même potentiel de développement que la cellule mère.

2.1. La quiescence

Les CS se divisent rarement et sont donc la plupart du temps quiescentes, c'est-à-dire qu'elles se trouvent en phase G0 du cycle cellulaire. Elles entrent en phase de prolifération suite à des stimuli pour repeupler un tissu dont les cellules meurent de façon naturelle (desquamation pour la peau, renouvellement permanent des cellules sanguines...) ou suite à une blessure nécessitant de reconstruire le tissu endommagé.

Les mécanismes par lesquels les cellules quiescentes préservent leur capacité à re-proliférer après des semaines ou des années d'arrêt de cycle cellulaire sont encore mal connus. Il a été montré récemment que l'expression d'HES1, un facteur de transcription, était nécessaire pour empêcher l'entrée en sénescence et permettre la sortie de quiescence de fibroblastes humains (Sang L *et al.*, *Science*, 2008). Cette fonction nouvelle d'HES1 pourrait s'étendre aux cellules souches, puisque HES1 est surexprimé dans les progéniteurs hématopoïétiques quiescents et joue un rôle dans l'inhibition de leur prolifération (Yu X *et al.*, *Stem Cells*, 2006).

Le concept de quiescence ou de dormance des cellules souches adultes normales est actuellement l'objet d'un intérêt majeur, principalement dans les modèles des cellules souches hématopoïétiques, des cellules souches intestinales et des cellules souches du follicule pileux (voir revues par Raaijmakers MH et Scadden DT, *Curr Opin Hematol.*, 2008 ; Blanpain C et Fuchs E, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2009). Les cellules souches hématopoïétiques peuvent passer de manière réversible d'un état « dormant » à un état prolifératif assurant leur autorenouvellement dans les conditions de l'homéostasie et au cours de la réparation après une agression (Wilson A *et al.*, *Cell* 2008). Les voies de transduction impliquées dans l'induction et la sortie de la dormance des cellules souches hématopoïétiques commencent à être identifiées (Essers MA *et al.*, *Nature*, 2009 ; Malhotra S et Kincade PW, *Cell Stem Cell*, 2009 ; Yamazaki S et Nakauchi H, *Curr Opin Hematol.*, 2009). De manière tout

à fait intéressante, et attendue, la sortie de quiescence s'accompagne de l'acquisition d'une sensibilité à l'effet des antimétabolites, ce qui ouvre des perspectives en cancérologie ([Essers MA et al., Nature, 2009](#)). Le groupe de Nishikawa et Osawa a par ailleurs montré qu'il était possible d'induire la quiescence de mélanoblastes en culture et de leur faire repeupler le compartiment « cellules souches » des follicules pileux ([Nishikawa S et Osawa M, Pigment Cell Res, 2007](#) ; [Yonetani S et al., J Invest Dermatol, 2008](#)). L'identification des facteurs impliqués dans le contrôle du passage réversible de l'état quiescent à l'état activé est en enjeu capital. Ces facteurs peuvent être intrinsèques ou extrinsèques (niche, cytokines...). Les implications potentielles dans le domaine du cancer sont considérables.

L'entrée en cycle des cellules souches est sous le contrôle des voies assurant la progression en phase G1 et l'entrée en phase S. Les inhibiteurs de CDK jouent un rôle majeur dans le contrôle de cette dernière étape en empêchant ou en retardant l'entrée en cycle des cellules souches ainsi que l'ont indiqué des expériences d'inactivation génique ([revue par Boyer MJ et Cheng T, Gene Ther., 2008](#)). Parmi les inhibiteurs de la famille CIP/KIP, p21 contribuerait au maintien du phénotype des cellules souches adultes en limitant leur entrée en cycle et leur prolifération, tandis que p27 serait un régulateur spécifique de l'expansion des cellules progénitrices. Les inhibiteurs de la famille INK4 participeraient également au contrôle de l'expansion des cellules souches, pour p18 et au maintien de leur fonctionnalité au cours du vieillissement, pour p16. Bmi-1, un membre de la famille de gènes Polycomb, indispensable à l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques et neurales, agirait en inhibant l'expression de p16 et ARF, en interagissant directement avec le locus Ink4-ARF ([revu par Grinstein E et Wernet P, Cell Signal., 2007](#)).

L'utilisation de l'approche génétique *in vivo* (inactivation génique et surexpression de gènes) a permis de progresser dans la compréhension des mécanismes qui contrôlent le cycle cellulaire des cellules souches, essentiellement dans le modèle des cellules souches hématopoïétiques ([Orford KW et Scadden DT, Nature Rev Genetics, 2008](#)). La voie PI3 kinase, les facteurs de transcription des familles myc, FOXO et HOX sont impliqués dans ce contrôle très complexe de même que la production des ROS, l'hypoxie et plus largement l'environnement créé par la niche.

2.2. L'autorenouvellement et la division asymétrique

Les CS sont capables de générer des copies d'elles-mêmes et de donner des cellules plus différenciées, appelée cellules progénitrices (CP) ou d'amplification transitoire (AT) selon les types cellulaires. La division asymétrique joue un rôle central dans la biologie des cellules souches (Figure 7). Cependant, elle est difficile à étudier pour des raisons expérimentales. C'est dans le modèle particulièrement bien adapté de la drosophile, que les mécanismes de la division asymétrique des cellules souches ont d'abord été élucidés (Knoblich JA, Cell, 2008). L'étude de la division asymétrique de ces cellules chez les vertébrés a commencé plus tardivement, car elle est particulièrement difficile. Des progrès récents et significatifs ont été obtenus sur les modèles du tissu nerveux, de l'épiderme (Blanpain C et Fuchs E, Nat.Rev.Mol.Cell Biol., 2009) et des cellules souches hématopoïétiques (Congdon KL et Reya T, Curr Op Immunol, 2008 ; Schroeder T, Cell Stem Cells, 2007 ; Wu M *et al.*, Cell Stem Cells, 2007).

La division asymétrique peut se faire par deux mécanismes : l'un intrinsèque, l'autre extrinsèque (interactions moléculaires et physiques) (Knoblich JA, Cell, 2008) liés également à l'orientation des faisceaux mitotiques.

Dans le premier mécanisme, qui a lieu dès le développement embryonnaire de la peau de souris, les CS expriment asymétriquement des régulateurs de l'auto renouvellement durant la mitose, donnant deux cellules filles différentes. Les faisceaux mitotiques sont perpendiculaires à la membrane basale. La cellule basale reste alors ancrée à la membrane basale par l'action d'intégrines alors que l'autre cellule fille s'en détache et commence à se différencier (Blanpain C et Fuchs E, Nat.Rev.Mol.Cell Biol., 2009).

Les mécanismes intrinsèques contrôlant la division asymétrique des CS se font à plusieurs niveaux.

- Au niveau de l'ADN : Cairns a émis l'hypothèse que la cellule souche conserve le brin d'ADN immortel et que la cellule d'amplification transitoire acquiert le brin nouvellement formé (Sell S, Crit Rev.Oncol.Hematol., 2004). Cette idée a été réfutée pour les CS hématopoïétiques. Les cellules ayant incorporé des analogues de la thymidine au cours de la phase S (BrdU, IdU, CldU) ségrègent ensuite leurs

brins d'ADN de façon aléatoire. En effet, on n'observe pas de ségrégation asymétrique du marqueur (Kiel MJ *et al.*, *Nature*, 2007).

- Au niveau des chromosomes : le centrosome de la cellule mère resterait du côté de la niche alors que le centrosome fille migrerait du côté opposé et aboutirait à la division asymétrique d'une CS (Yamashita YM *et al.*, *Science*, 2007).

Certains complexes protéiques sont différemment exprimés aux deux pôles cellulaires lors de la division. C'est le cas pour des molécules d'attachement comme les cadhérines, la β caténine ou l'APC (Adenomatosis Polyposis Coli) (Sell S, *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 2004) ou des protéines contrôlant l'auto-renouvellement des CS comme oct3/4, Wnt, Notch ou Numb (Shinin V *et al.*, *Nat.Cell Biol.*, 2006).

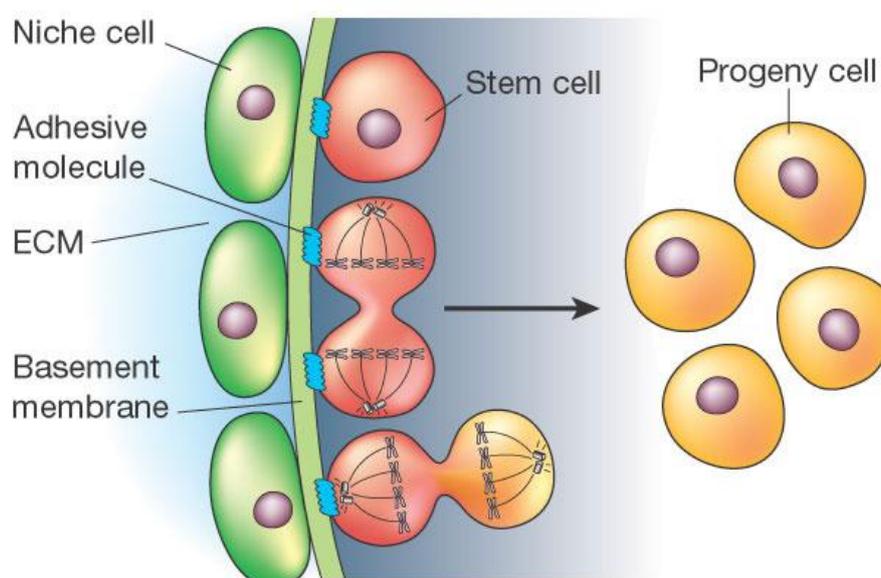


Figure 7 : Division symétrique et asymétrique des cellules souches. Selon l'orientation du plan de clivage, les CS peuvent se diviser symétriquement pour donner deux CS ou asymétriquement pour donner une CS et une cellule progénitrice qui entre ensuite en phase de différenciation.
D'après Spradling, Drummond-Barbosa et Kai, Nature, 2001.

Le deuxième mécanisme est lié au fait que les CS sont en contact avec la niche et donc dépendent des signaux qu'elle leur envoie (Morrison SJ et Kimble J., *Nature*, 2006). Quand les fuseaux sont positionnés parallèlement à la membrane basale, comme dans la queue de souris, les deux cellules filles restent dans la couche basale et se divisent symétriquement (Sell S, *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 2004). Ensuite une des cellules peut recevoir des signaux qui dérèglent l'expression

des intégrines et induisent le détachement de la cellule de la membrane basale ou alors les deux cellules restent souches pour pouvoir accroître le nombre de CS au sein du tissu.

Il reste à déterminer si l'orientation des fuseaux mitotiques est liée à la détermination du destin asymétrique, et comment. Au niveau du développement épidermique, il est connu que l'orientation des fuseaux change temporairement en fonction des besoins du développement pour soit augmenter le nombre de cellules dans la couche basale, car la taille de l'embryon augmente, ou alors stratifier l'épiderme et éliminer les cellules suprabasales.

L'existence d'un lien entre la perturbation du contrôle de la division asymétrique et le cancer, soupçonné depuis longtemps, a été documentée de manière élégante chez la drosophile, avec l'induction de tumeurs métastatiques suite à la mutation de gènes contrôlant la division asymétrique des neuroblastes (Gonzalez C, *Nature Rev Genetics*, 2007). De manière très intéressante, un oncogène comme NUP98-HOXA9 empêcherait la division asymétrique et favoriserait la division symétrique de cellules souches hématopoïétiques chez la souris (Wu M *et al.*, *Cell Stem Cells*, 2007), suggérant un rôle de la perturbation du contrôle de la division asymétrique dans l'oncogenèse chez les mammifères.

2.3. La multipotence et la différenciation

La cellule issue de la fusion entre l'œuf et la cellule spermatique (zygote) est totipotente, pouvant donner tous les types cellulaires d'un organisme. Suite aux 5-6 premières divisions de l'œuf (gastrulation), on aboutit à la blastula composée de groupes de cellules, appelées cellules de la masse interne, pouvant se différencier en tous les types cellulaires issus des 3 feuillets embryonnaires. Elles sont appelées cellules souches embryonnaires (cellules ES) et sont qualifiées de pluripotentes, ce qui signifie qu'elles ne peuvent donner, par différenciation, que des cellules appartenant aux feuillets embryonnaires (ectoblaste, mésoblaste et endoblaste) soit environ 200 types cellulaires. Les cellules résultantes se différencient à leur tour jusqu'à donner des cellules souches multipotentes, présentes dans la plupart des

organismes multicellulaires adultes, moins primitives que les cellules ES et ne pouvant produire que des types cellulaires bien définis (Alonso L et Fuchs E, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2003). Ces cellules multipotentes, appelées cellules souches adultes ont un potentiel prolifératif plus limité que les cellules ES. Leur potentiel de différenciation va diminuer au fur et à mesure des divisions successives. Les cellules de toutes ces divisions sont alors unipotentes et ne peuvent se différencier qu'en cellules matures fonctionnelles, responsables du renouvellement tissulaire, de l'homéostasie et de la régénération tissulaires (Sell S, Crit Rev.Oncol.Hematol, 2004).

La démonstration du potentiel « souche » d'une cellule repose sur des arguments expérimentaux obtenus *in vitro* et *in vivo*.

La vérification du potentiel de différenciation d'une cellule est réalisable par les essais *in vitro* en cultivant les cellules dans des milieux spécifiques de chaque type cellulaire. Le plus souvent, il s'agit de culture simple en deux dimensions avec caractérisation du phénotype des cellules obtenues. Des modèles de culture en trois dimensions sont également utilisés. Dans le cas de la peau, les cellules souches permettent de produire des équivalents de peau en culture ou « skin equivalents ». La vérification la plus complète du potentiel d'une cellule souche est réalisée *in vivo*. L'injection d'une cellule souche (par exemple chez la souris) doit pouvoir donner naissance aux différents types cellulaires dérivant normalement de la cellule souche considérée. Cette technique est particulièrement utilisée dans la caractérisation des cellules souches hématopoïétiques, avec la mise en évidence de cellules capables de repeupler la moelle osseuse de souris en aplasie complète. La reconstitution tissulaire obtenue doit être complète et durable dans le temps : notion de « Long Term Repopulating Cells, LTRC, dans le cas des cellules souches hématopoïétiques.

2.4. La plasticité des cellules souches adultes : modèle hiérarchisé /réversibilité

Classiquement, les cellules souches adultes apparaissent et s'organisent en un modèle strictement hiérarchisé mis en place au cours du développement

embryonnaire. Leur plasticité (capacité à donner d'autres tissus que celui qu'elles produisent normalement) est faible et concerne essentiellement les cellules souches d'origine mésenchymateuse et les types cellulaires en dérivant (fibroblaste, chondroblaste, adipocyte, myoblaste). Au début des années 2000, de nombreux travaux ont semblé montrer que les cellules souches adultes présentaient en fait une plasticité bien plus grande que communément admis, avec des possibilités de « transdifférenciation » apparemment sans limite (production de cellules hépatiques à partir de cellules souches hématopoïétiques, de précurseurs hématopoïétiques à partir de cellules souches nerveuses...) ouvrant des perspectives thérapeutiques extraordinaires. Cette notion nouvelle a fait l'objet d'une polémique, du fait de la possibilité de divers biais expérimentaux, notamment la possible présence de cellules souches contaminantes, d'éventuelles cellules souches pluripotentes adultes ou la fusion cellulaire de cellules souches avec des cellules différenciées (Lakshmipathy U et Verfaillie C, *Blood Rev*, 2005). Suite à cet épisode, une attention plus grande a été apportée à la caractérisation des cellules souches, à leur fractionnement et à l'étude de leur biologie. La possibilité d'une éventuelle transdifférenciation des cellules souches mésenchymateuses continuent de susciter un intérêt intense (Phinney DG et Prockop DJ, *Stem Cells*, 2007)

2.5. Peut-on induire la dédifférenciation et reprogrammer des cellules adultes?

La plasticité cellulaire vraie consiste en la dédifférenciation suivie de redifférenciation en un tissu différent de celui d'origine ou en la transdifférenciation. Il est en fait possible de manipuler des cellules adultes pour générer des cellules ressemblant aux cellules souches embryonnaires et ayant acquis un potentiel pluripotent de différenciation. Les techniques utilisées sont : (i) l'exposition à des facteurs présents au sein de l'ovocyte par transfert nucléaire (principe du clonage de Dolly), (ii) l'exposition à des facteurs exprimés dans des cellules pluripotentes (cellules ES par exemple) par fusion cellulaire et (iii) la reprogrammation nucléaire directe par surexpression de certains facteurs de transcription (Jaenisch R et Young R, *Cell*, 2008). Les facteurs de transcription utilisés sont des régulateurs essentiels de l'autorenouvellement et de la destinée des cellules souches (Oct4, Sox2, Nanog,

Lin-28) et des facteurs de transcription pléiotropes, impliqués dans le contrôle de la biologie des cellules souches mais ayant bien d'autres effets, notamment oncogènes (c-Myc et Klf4). Les CS pluripotentes induites par ces facteurs, appelées iPS, ont un caryotype normal, expriment l'activité télomérase, ainsi que des marqueurs de surface cellulaire et les gènes qui caractérisent les cellules souches embryonnaires et sont capables de se différencier en dérivés des 3 feuillets embryonnaires primaires. La méthode des iPS connaît un développement extraordinaire depuis sa description en 2006, du fait des perspectives qu'elle ouvre en thérapie cellulaire ([Amabile G et Meissner A, Trends Mol Med, 2009](#)). Les cellules iPS présentent-elles une pluripotence réellement identique à celle des cellules ES ? Est-ce que ce phénomène de reprogrammation peut se passer dans des cellules normales soumises à une pression de leur environnement ? Ces questions et bien d'autres, comme le risque de transformation des cellules iPS, sont loin d'être résolues. Il faudra pour les résoudre une meilleure définition moléculaire et cellulaire de la pluripotence et la façon de l'évaluer expérimentalement ([Smith KP et al., J Cell Physiol, 2009](#)) ainsi qu'une amélioration des procédés de préparation de ces cellules, en particulier dans le choix des vecteurs viraux utilisés ([Yu J et al., Science, 2007](#). [Stadtfeld M et al., Science, 2008](#) ; [Okita K et al., Science, 2008](#)).

3. La niche

Les CS sont présentes dans les tissus en renouvellement permanent comme le cerveau, la moelle osseuse, la muqueuse intestinale, le système hématopoïétique, la cornée ou encore la peau. D'autres tissus comme le cœur semblent ne pas posséder de CS et n'auraient donc pas la possibilité de se régénérer en cas de lésion.

Les CS résident dans un microenvironnement particulier appelé « niche » qui comprend les cellules souches elles-mêmes, des cellules de soutien et des facteurs solubles ([Alonso L et Fuchs E, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2003](#)).

Les cellules entourant les CS sont importantes pour leur maintien. Elles font partie de la matrice extracellulaire, nourrissent les CS et contrôlent leur bon fonctionnement.

L'ensemble des différentes cytokines fournies par la niche permet de contrôler le taux de prolifération des CS, leur auto renouvellement (Spradling A *et al.*, *Nature*, 2001), leur division, leur survie, évite l'épuisement du nombre de CS (Orford KW *et al.*, *Nat.Rev.Genet.*, 2008). Des signaux induisent aussi la migration, la différenciation et l'apoptose des cellules progénitrices.

L'application de la technique des LRC (Label Retaining Cells ou cellules qui conservent un marquage voir paragraphe 4.1.1.) dans le tissu cutané et ses annexes a pu mettre en évidence la présence de 5 à 10% de ces cellules au niveau de l'épiderme (Lavker RM *et al.*, *Exp.Eye Res.*, 2004). Les LRC de la peau sont confinées au niveau d'une région spécifique appelé bulge. Cette niche se trouve dans la gaine externe du follicule pileux, prolongement de la couche basale interfolliculaire et situé sous la glande sébacée (Figure 1). Par marquage de ces cellules, il a été montré que les cellules de cette niche (Lavker RM *et al.*, *J.Invest Dermatol.*, 1993 ; Taylor G *et al.*, *Cell*, 2000) peuvent, selon les besoins, migrer soit vers le follicule pileux, soit vers les glandes sébacées, soit vers l'épiderme interfolliculaire (Ito M *et al.*, *Nat.Med.*, 2005 ; Levy V *et al.*, *Dev.Cell*, 2005 ; Morris RJ *et al.*, *Nat.Biotechnol.*, 2004). Les CS du bulge s'auto renouvellent donc pour maintenir un nombre constant et se différencient en cellules progénitrices qui quittent le bulge pour former les follicules pileux, les glandes sébacées ainsi que l'épiderme (Morasso MI et Tomic-Canic M, *Biol.Cell*, 2005).

Le maintien de la niche se base sur une bonne connexion entre les CS et les cellules environnantes. Ce maintien est solide grâce aux molécules d'adhérence (comme les cadhérines) formant les jonctions adhérentes. Jusque là, on ne sait pas encore quelle sous-famille de cadhérine est spécifiquement nécessaire pour le maintien des CS et si une trop grande quantité de protéines n'interfère pas avec le bon fonctionnement du système. D'autres molécules sont importantes comme les intégrines, notamment l'intégrine $\alpha 6$ hautement exprimée dans les kératinocytes basaux de l'épiderme même si son rôle précis n'a pas encore été trouvé.

Etant donné le nombre de composants et la complexité des interactions entre les CS et la niche, il est difficile d'étudier les mécanismes régissant l'activité des niches. C'est un système en quatre dimensions où chaque élément venant de tous

les cotés ainsi que son évolution dans le temps sont difficiles à contrôler. Etudier les mécanismes mis en jeu dans la liaison entre les CS et la niche est primordial. Des recherches récentes ont montré qu'un changement dans l'élasticité de la niche peut induire la différenciation des cellules à tout moment. La dérégulation de la niche peut être une cause du développement de nombreuses pathologies associées avec la dégénération tissulaire, le vieillissement ou la tumorigénèse ([Mitsiadis TA et al., Exp.Cell Res., 2007](#)).

Etudier ces mécanismes est cependant difficile, car il n'a pas encore été possible de reproduire la niche *in vitro* par manque de connaissances et les CS mises en culture se différencient très vite. Ceci renforce l'importance de la niche pour la biologie des CS.

4. Quels sont les marqueurs des CS ?

Les cellules souches adultes sont indifférenciées. Elles sont de petite taille, nettement inférieure à celle des cellules plus mûres du même tissu, ont un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, une faible quantité d'organites cytoplasmiques et une abondance de ribosomes libres et de glycogène. Ces caractéristiques n'ont rien de très spécifique. Tout récemment l'existence de très rares et très petites cellules souches ressemblant à des cellules souches embryonnaires a été documentée dans les tissus adultes ([Zuba-Surma EK et al, Cytometry, 2009](#)). Ces cellules seraient des cellules souches très primitives et pluripotentes. Leur très petite taille a été utilisée comme paramètre important lors de leur fractionnement, en combinaison avec d'autres marqueurs des cellules souches.

Disposer de marqueurs spécifiques permettant d'identifier et de purifier les cellules souches est un enjeu essentiel. La caractérisation de tels marqueurs est difficile parce que les cellules souches sont par définition non différenciées et n'expriment que peu de marqueurs spécifiques. De plus, elles sont très peu abondantes.

De nombreux marqueurs ont été proposés. On peut les classer en deux grands types :

4.1. Les marqueurs liés à la mise en œuvre d'un test fonctionnel spécifique des propriétés des cellules souches

4.1.1. Le cycle cellulaire lent : Label Retaining Cells

Pour détecter les cellules se divisant le plus rarement, les techniques d'incorporation de la thymidine tritiée ($^3\text{H-T}$) ou de la bromodeoxyuridine (BrdU) sont majoritairement utilisées. Ces analogues de nucléotides s'intègrent dans l'ADN des cellules en phase de réplication, permettant de marquer l'ensemble des cellules en prolifération y compris les cellules souches si l'exposition est longue. L'incorporation est réalisée lors d'une première phase, appelée pulse, et elle est suivie par une période d'arrêt d'exposition (chase), où on laisse les cellules en culture quelque temps (4 à 8 semaines) sans l'agent marqué afin que les cellules en phase active de prolifération se divisent et perdent le marquage par distribution symétrique du marqueur (son intensité est divisée par moitié à chaque division). Seules les CS qui se divisent rarement, retiennent le marquage. Elles sont donc appelées « Label Retaining Cells » ou LRC (Braun KM et Watt FM, *J.Invest.Dermatol.Symp.Proc.*, 2004, Morris RJ et Potten CS, *Cell Prolif.*, 1994 ; Lavker RM *et al.*, *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.*, 2003). Cette technique peut être utilisée dans des cultures cellulaires *in vitro* et également *in vivo*

Les cellules souches sont quiescentes et donc majoritairement en phase G0/G1 du cycle cellulaire, une caractéristique analysable par cytométrie de flux suite au marquage des cellules avec des sondes fluorescentes s'intercalant dans l'ADN. L'étude plus approfondie des CS hématopoïétiques (HSC) a révélé que 75% de ces cellules restent très longtemps en phase G0. Elles sont alors appelées Long-Term repopulating hematopoietic stem cells (LT-HSC) (Orford KW *et al.*, *Nat.Rev.Genet.*, 2008).

4.1.2. La clonogénicité – CFU et la formation de sphères

La capacité d'autorenouvellement des cellules souches est explorée par leur faculté à former des clones cellulaires *in vitro*. Largement utilisée dans le domaine pionnier des cellules souches hématopoïétiques, elle s'applique aussi à l'étude des cellules souches épithéliales. L'étude des cellules souches de l'épiderme fournit un bon exemple des approches utilisées. Les kératinocytes peuvent générer trois types de colonies : de larges colonies, appelées holoclones, de petites colonies, appelées paraclones et des colonies intermédiaires, appelées méroclones (Barrandon Y et Green H, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1987). Il s'est avéré que les kératinocytes capables de former des holoclones présentent des caractéristiques de différenciation *in vitro* accrues et un potentiel de prolifération infini, propriétés des CS.

Les cellules souches adultes peuvent être aussi étudiées en utilisant leur capacité à générer des sphères quand on les cultive en suspension. D'abord appliquée à l'étude des cellules souches nerveuses, cette approche a été étendue aux cellules souches mammaires, puis à d'autres tissus (Campos LS, J Neurosci Res, 2004 ; Dontu G et al., Genes Dev, 2003). Les neurosphères et les mammosphères sont rapidement apparues comme des outils bien adaptés à la caractérisation des cellules souches et à l'étude de leurs propriétés fondamentales. La capacité à former des sphères est également utilisée pour enrichir les populations de cellules souches normales (Liao MJ et al., Cancer Res, 2007) ou pour caractériser les cellules souches tumorales (Rappa G et al., Exp Cell Res, 2008)

4.1.3. L'exclusion de colorants vitaux : la « Side Population »

Les cellules souches ont la propriété d'exclure certains colorants vitaux comme le Hoechst 33342. La population effluant la sonde est appelée « side population » et contient les cellules souches. D'abord décrite pour les cellules souches hématopoïétiques murines, cette propriété a été ensuite mise en évidence pour les cellules souches de la plupart des tissus et proposée comme méthode universelle de fractionnement des cellules souches normales et tumorales (revu par Challen GA et Little MH, Stem Cells, 2006 ; Hadnagy A et al., Exp Cell Res, 2006). Si

l'association entre cellules souches et « side population » est bien documentée, elle n'est pas parfaite et on peut parfois trouver des cellules souches dans la population non SP et des cellules non souches dans le compartiment SP.

La SP est un marqueur non complètement spécifique. Elle gagne donc à être utilisée chaque fois que possible en combinaison avec d'autres marqueurs des cellules souches comme ceci a été fait avec l'intégrine $\alpha 6$ dans les kératinocytes (Terunuma A *et al.*, *Stem Cells*, 2007), le CD45 dans l'épithélium des voies aériennes (Hackett TL *et al.*, *Stem Cells*, 2008), BMI1 dans les cellules de carcinome hépatocellulaire (Chiba T *et al.*, *Cancer Res.*, 2008).

Le phénotype « side population » est lié à l'expression de transporteurs de la famille ABC (ATP – binding cassettes). Il existe 49 membres de cette famille chez l'Homme, dont une dizaine sont impliqués dans l'efflux des xénobiotiques et la résistance aux médicaments (Sharom FJ, *Pharmacogenomics*, 2008 ; Schinkel AH et Jonker JW, *Adv Drug Delivery Rev*, 2003). Les mieux connus sont ABCB1 (P-Glycoprotéine ou Pgp), ABCC1 (ou MRP1) et ABCG2 (ou BCRP). Ces transporteurs sont plus polyspécifiques que monospécifiques. Ils transportent les sondes fluorescentes comme le Hoechst 33342, la rhodamine 123 ou la calcéine, avec parfois une intéressante spécificité. Par exemple, la calcéine est transportée par ABCC1, mais pas par ABCB1 ou ABCG2. Des polymorphismes ou des mutations spontanées en culture peuvent être responsables de changements de spécificité et d'efficacité du transport : la forme sauvage d'ABCG2 ne transporte pas la rhodamine 123, alors que certains de ses mutants spontanés le font. Enfin ces transporteurs comportent des sites multiples de liaison des xénobiotiques, pouvant être indépendants ou interagir de manière allostérique.

Une corrélation entre l'expression de ces transporteurs, le phénotype « side population » et les cellules souches a été décrite pour les cellules souches hématopoïétiques (de Jonge-Peeters SD *et al.*, *Crit Rev Onco/Hematol*, 2007) et un nombre croissant de cellules souches épithéliales. Du fait du nombre de transporteurs possiblement impliqués et de la complexité de leurs interactions avec leurs ligands, il n'existe pas forcément de corrélation entre l'expression d'un transporteur donné et le phénotype SP d'un type particulier de cellules. Très peu d'études comparant l'expression de tous les transporteurs ABC dans les cellules souches ont été réalisées.

En conclusion, la « side population » est un marqueur fonctionnel très intéressant et facile à mettre en œuvre, mais dont il convient d'apprécier les limites.

4.1.4. L'activité aldéhyde déshydrogénase

L'existence d'une activité aldéhyde déshydrogénase (ALDH) a été proposée comme marqueur des cellules souches et connaît un succès croissant du fait de la facilité de sa mise en œuvre en cytométrie de flux ([revu de Moreb JS, Curr Stem Cell Res Ther, 2008](#)). Elle est corrélée à l'expression d'isoenzymes de la famille des ALDH, dont il existe 19 membres chez l'Homme. L'activité ALDH des cellules souches hématopoïétiques a été attribuée à l'isoforme ALDH1A, mais ce n'est sans doute pas la seule isoforme à pouvoir être responsable de l'activité ALDH de ces cellules ([Levi BP et Morrison SJ, Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol., 2009](#)).

4.1.5. L'adhérence différentielle

Le groupe de Fiona Watt a montré il y a 16 ans que les cellules souches épidermiques pouvaient être purifiées sur la base de leur adhérence rapide à des protéines de la matrice extracellulaire, une propriété perdue par leur descendance engagée dans la voie de la différenciation : cellules d'amplification transitoire et kératinocytes différenciés ([Jones PH et Watt F, Cell, 1993](#)). Cette propriété a été mise en rapport avec l'expression de l'intégrine $\beta 1$ et une purification à 90% a été rapportée. La même méthode a été utilisée avec succès pour le fractionnement des cellules souches épidermiques de souris, sans qu'une intégrine spécifique puisse être incriminée ([Bickenbach JR et Chism E, Exp Cell Res, 1998](#)).

Cependant, d'autres auteurs ont montré que l'adhérence rapide à un substrat et l'expression de l'intégrine $\beta 1$ ne sont pas des marqueurs absolus des cellules souches épidermiques humaines et que l'utilisation combinée d'un autre marqueur était nécessaire pour purifier ces cellules ([Kaur P et Li A, J Invest Dermatol, 2000](#)).

4.2. Les marqueurs moléculaires

De nombreuses revues ont été consacrées aux marqueurs des cellules souches adultes normales et tumorales ([Alison MR et Islam S, J Pathol, 2009](#) ; [Natarajan TG et Fitzgerald KT, Cancer Biomarkers, 2007](#))

4.2.1. Les marqueurs généraux des cellules souches - « stemness »

Différents marqueurs liés à la fonction des cellules souches, principalement des facteurs de transcription, sont exprimés dans ces cellules. Ces marqueurs intracellulaires sont peu utilisables pour le fractionnement des cellules souches, mais contribuent à leur caractérisation. On peut citer Oct4, important pour la pluripotence des cellules souches embryonnaires et exprimé dans divers types de cellules souches adultes ; Bmi-1 essentiel pour l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques ; la β -caténine nucléaire, un acteur majeur de la voie Wnt ; Mushashi-1 impliqué dans la voie Notch.

L'analyse transcriptomique des cellules souches se développe pour découvrir des gènes dont l'expression est spécifique de ces cellules ([revu par Ma L et al., Clin Chimica Acta, 2007](#)). Les cellules souches embryonnaires, hématopoïétiques et nerveuses sont les plus étudiées. Différents profils d'expression ont été décrits, impliquant notamment des gènes contrôlant la biologie des cellules souches (Oct4, nanog, Sox2...), les grandes voies du développement (Wnt, TGF β , Shh, homeobox, Bmi...), des régulateurs du cycle cellulaire et de la structure de la chromatine. Il semble se confirmer que les différents types de cellules souches adultes pourraient partager un patron commun d'expression de certains gènes, défini par le terme de « stemness », même si cette notion a été controversée ([Doherty JM et al., Stem Cells, 2008 et références citées](#)). Le profil des cellules souches se distingue de celui des progéniteurs et des cellules engagées dans la différenciation. Une réversion du transcriptome de cellules engagées dans la voie endothéliale vers un profil de type cellule souche hématopoïétique a pu être obtenue après expression forcée de GATA2, un gène caractéristique du profil des cellules souches hématopoïétiques

(Huang TS *et al.*, *Stem Cells*, 2008), traduisant une possibilité de reprogrammation des cellules par manipulation de leur réseau de contrôle transcriptionnel.

4.2.2. Les marqueurs spécifiques des différents types de cellules souches (tissu spécifique)

Ces marqueurs peuvent être intracellulaires, comme par exemple les kératines 14 et 15 pour les cellules souches de l'épiderme (cellules basales et du bulge) ou la cytokératine 19 dans les cellules souches mammaires. Mais ce sont surtout les marqueurs membranaires qui suscitent le plus d'intérêt, car ils peuvent être utilisés pour purifier les cellules souches. On peut citer le CD34 pour les cellules souches hématopoïétiques, la nestine pour les cellules souches neurales ou le CD44 pour les cellules souches épithéliales mammaires. En fait, aucun marqueur n'est réellement spécifique d'un type de cellule souche et une combinaison de marqueurs est souvent utilisée. C'est dans le cas des cellules souches hématopoïétiques que les marqueurs découverts sont les plus nombreux et que la caractérisation de leurs différents types et sous-types et de leur hiérarchie est la mieux établie (Alison MR et Islam S, *J Pathol*, 2009 ; Ratajczak MZ, *Curr Opin Hematol*, 2008).

4.2.3. La variabilité de l'expression des marqueurs avec l'état fonctionnel de la cellule souche

L'expression de certains marqueurs membranaires peut se modifier au cours de l'isolement des cellules souches ou au cours de leur activation. C'est le cas du CD34, dont l'expression ne serait pas une caractéristique permanente des cellules souches hématopoïétiques, mais plutôt un reflet de leur activation (Ratajczak MZ, *Curr Opin Hematol*, 2008)

5. Le contrôle de la division et de la différenciation des cellules souches : l'exemple des cellules souches épidermiques (Figure 8)

Les voies de contrôle de la division et de la différenciation des cellules souches font l'objet d'une recherche intense, malgré la difficulté de la préparation des cellules souches. Cette régulation est complexe et implique de très nombreuses voies. Nous prendrons les cellules souches épidermiques comme exemple.

Dans la peau, il existe différents compartiments de CS : l'épiderme interfolliculaire, le follicule pileux, et les glandes sont maintenus par leurs propres cellules souches (Ambler CA et Maatta A, *J Pathol*, 2009), bien que les cellules souches localisées dans le bulge du follicule pileux puissent se différencier en tous les lignages épidermiques et sont considérées comme multipotentes. La relation exacte entre les cellules souches et leur hiérarchie est encore controversée et très complexe, tout comme est controversé le choix des marqueurs des cellules souches épidermiques, leur localisation et leur potencie. L'identification récente des cellules souches pluripotentes issues des crêtes neurales et résidant dans le bulge (Sieber-Blum M *et al.*, *Dev Dyn*, 2004) augmente la complexité des cellules souches épidermiques. Cependant, les cellules souches du bulge sont considérées comme les cellules souches les plus primitives de l'épiderme, alors que les cellules souches de la couche basale de l'épiderme interfolliculaire sont des cellules souches seulement engagées dans la régénération de l'épiderme.

Bien que de nombreuses données concernent la localisation des CS épidermiques, les voies de régulation concernant le destin des cellules souches et des cellules progénitrices restent encore mal définies. Le processus de différenciation de l'épiderme normal adulte montre des similitudes avec le développement embryonnaire de l'épiderme. De ce fait, les études sur la cascade de signalisation responsable du développement épidermique peuvent permettre d'élucider les mécanismes de régulation de la différenciation épidermique (Aberdam D, *Int.J.Dev.Biol.*, 2004). Il est établi que les cellules embryonnaires possèdent un potentiel de croissance et de différenciation important, nécessaire pour la morphogénèse des organes et l'expansion durant le développement. Cependant les propriétés intrinsèques des cellules embryonnaires restent mal définies. Les

changements morphogéniques associés à la stratification ont été bien étudiés, mais les mécanismes régulant la différenciation épidermique sont encore mal connus. Parmi les signaux moléculaires gouvernant les interactions épithéliales-mésenchyme induisant la morphogénèse épithéliale et l'homéostasie, Wnt et BMP (Bone Morphogenesis Protein) ont des rôles spécifiques dans le développement des CS.

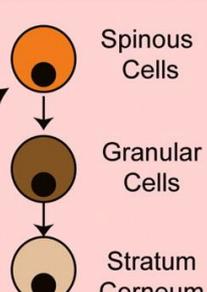
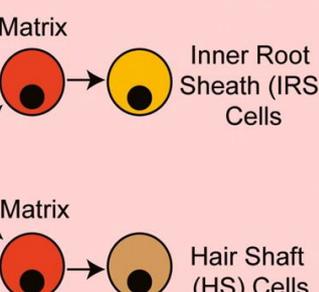
	Stem Cell	Proliferative Progeny	Differentiated Cells	Mechanisms of Stem Cell Regulation
Epidermis			 Spinous Cells Granular Cells Stratum Corneum	Proliferation c-Myc $\beta 1$ integrin p63 TGF α TGF $\beta(-)$ Differentiation Notch C/EBP α/β PPAR α AP2 α/γ
Hair Follicle		 ORS/HG	 Matrix Inner Root Sheath (IRS) Cells Matrix Hair Shaft (HS) Cells	Proliferation BMP(-) Wnt NFATc1(-) PTEN(-) Differentiation (IRS): Notch BMP CDP GATA3 (HS): Wnt, Lef1, Notch (Mx): Msx1/2, Ovo1, Foxn1, Shh
Sebaceous Gland			 Sebocytes	Proliferation Blimp1(-) hedgehog c-Myc Wnt(-) Differentiation PPAR γ

Figure 8 : Mécanismes moléculaires contrôlant la prolifération et la différenciation de l'épiderme. La prolifération et la différenciation des cellules de l'épiderme interfolliculaire, du follicule pileux et des glandes sébacées sont régulées par des facteurs propre à chaque sous type de cellules épidermiques.
Fuchs and Horsley, Gene and Development, 2008.

5.1. La voie BMP et TGF

La voie BMP (Bone Morphogenesis Protein), active dans l'épiderme inter folliculaire (Blanpain C et Fuchs E, *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 2006 ; Zhang J *et al.*, *Stem Cells*, 2006) est importante au niveau de la niche. La perte de la voie de signalisation BMP ou/et NFATc1 compromet la quiescence des cellules (Kobielak K *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2007 ; Horsley V *et al.*, *Cell*, 2008).

Le TGF β (Transforming Growth Factor) fait partie de la famille des cytokines multifonctionnelles jouant un rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire par la régulation des processus de croissance, de différenciation et d'apoptose cellulaire, ainsi que la formation de la matrice extracellulaire, la réponse immunitaire et l'angiogénèse. Ce facteur se lie à son récepteur qui, activé, phosphoryle les médiateurs intracellulaires appelés Smad, qui formeront des complexes migrant au noyau et fonctionnant comme facteurs de transcription (Zimmerman CM et Padgett RW., *Gene*, 2000). TGF β joue donc un rôle dans l'inhibition de la prolifération, notamment en régulant positivement les inhibiteurs de CDK comme p16, p21 ou p27 tout en favorisant la différenciation des kératinocytes.

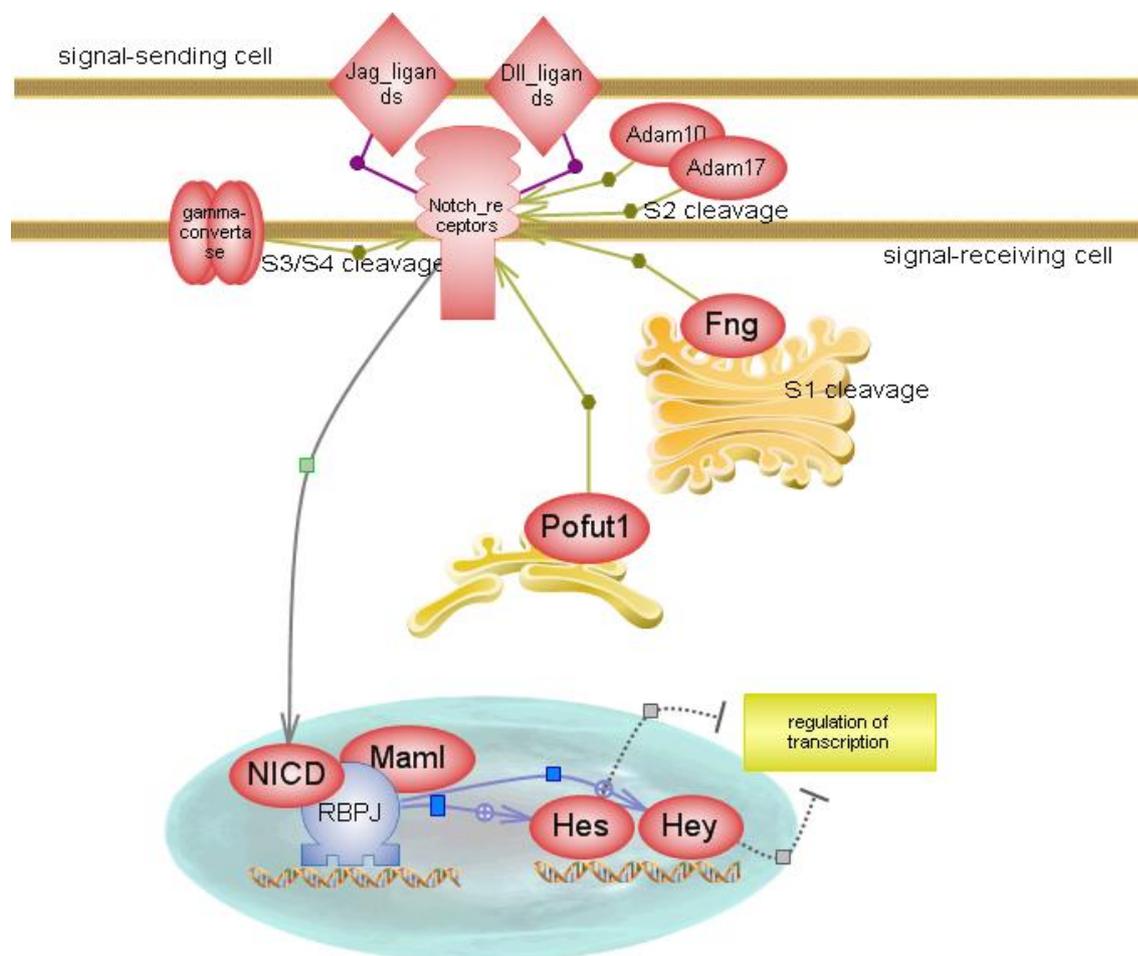
La voie du TGF β inhibe la prolifération épidermique en régulant c-Myc dont l'expression endogène est indispensable pour l'homéostasie de la peau. La sur expression de ce facteur de transcription entraîne une hyper prolifération.

5.3. La voie Notch

Le rôle de Notch dans le développement est accompagné d'une action oncogénique dans la prolifération de différents types de CS (hématopoïétique, neuronal, mammaire).

La voie de Notch est importante dans la détermination entre division asymétrique et différenciation. Lorsque le ligand se lie à son récepteur Notch, celui-ci subit alors deux clivages protéolytiques. Le premier est réalisé par les métalloprotéinase de la famille ADAM. Ceci génère un substrat pour le deuxième évènement protéolytique effectué par le complexe de sécrétase γ qui libère le domaine intra cellulaire de Notch (DICN) de la membrane plasmique. Ce domaine

entre dans le noyau pour former un complexe avec une protéine liant l'ADN, RBP-Jk, qui active les gènes cibles comme les gènes de la famille Hes ou Hey (Blanpain C *et al.*, *Cell*, 2007). Notch a un rôle important dans la niche puisqu'il a été montré que les cellules avec un haut niveau d'activité Notch inhibent la différenciation des cellules environnantes (Watt FM *et al.*, *Curr.Opin.Cell Biol.*, 2008).



ARIADNE

Figure 9 : La voie Notch. Lorsque le ligand se lie à son récepteur Notch, celui-ci subit alors deux clivages protéolytiques ce qui libère le domaine intra cellulaire de Notch (NICD) de la membrane plasmique qui entre dans le noyau pour former un complexe avec la protéine liant l'ADN RBP-Jk qui active les gènes cibles comme les gènes de la famille Hes ou Hey.

De façon intéressante, les kératinocytes embryonnaires semblent posséder un fort potentiel de différenciation et s'y engagent plus précocement que les cellules nouvellement synthétisées. Ceci pourrait s'expliquer par la surexpression de la voie

Notch, au sein des kératinocytes de l'épiderme embryonnaire, ainsi que par la surexpression de la caspase-3 qui a été identifiée comme une cible transcriptionnelle de Notch1 (Okuyama R *et al.*, *Dev.Cell*, 2004). Il a été rapporté que l'absence d'expression de la caspase-3, *in vivo*, résulterait en une hyperprolifération et une diminution de la différenciation des kératinocytes embryonnaires interfolliculaires, ainsi qu'une baisse d'activation de PKC δ , substrat de la caspase-3, qui agit comme régulateur positif de la différenciation. Il semblerait que la différenciation terminale des kératinocytes embryonnaires soit sous le contrôle d'un mécanisme passant par Notch/caspase-3.

Numb est un inhibiteur de Notch qui peut induire l'autorenouvellement cellulaire, puisque la voie Notch dérégule l'expression des intégrines et a été montrée comme intervenant dans la division asymétrique chez *Drosophila melanogaster*.

5.4. La voie Wnt

La voie de signalisation Wnt/ β caténine est impliquée dans le maintien de l'homéostasie des CS au niveau de la niche de la plupart des tissus épithéliaux comme la peau, les glandes mammaires ou l'intestin (Reya T et Clevers H, *Nature*, 2005). La β caténine est stable au niveau des jonctions adhérentes.

Lorsque la voie est inactive, la β caténine intracellulaire est phosphorylée puis dégradée. Son expression nucléaire est faible, Tcf3/4 peut alors maintenir les CS du bulge dans leur état indifférencié. Mais quand la voie est activée, la β caténine est transloquée au noyau pour former un complexe avec les facteurs de transcription Tcf/Lef (Lowry WE *et al.*, *Genes Dev.*, 2005) et moduler l'expression de nombreux gènes cibles de Wnt, impliqués dans la différenciation. Ceci aboutit à la sortie des CS de la niche, leur prolifération et induit la différenciation des cellules dans le lignage du follicule pileux (Watt FM et Collins CA, *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 2008).

Dans la peau, les cellules souches quiescentes du bulge expriment une forme soluble d'un inhibiteur de Wnt tel que FRP1 ou Wif (Morris RJ *et al.*, *Nat.Biotechnol.*, 2004) et la β caténine maintient les CS actives (Braun KM, *Cell Stem Cell*, 2008). Un haut niveau de β caténine mène à la croissance des cheveux, la formation des

follicules pileux. L'inhibition de la β caténine bloque la formation des cheveux durant le développement.

La sur-activation de cette voie mène à la formation de cancers épithéliaux (Reya T et Clevers H, *Nature*, 2005). Il a été montré que la β caténine est fortement exprimée et localisée au niveau du noyau dans les carcinomes humains (Malanchi I *et al.*, *Nature*, 2008)

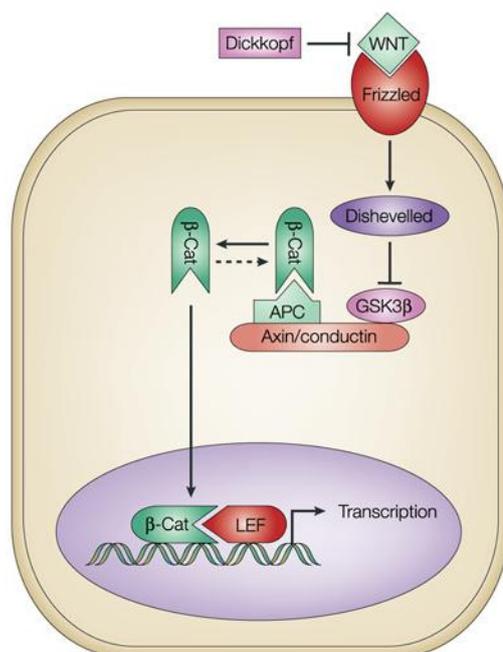


Figure 10 : La voie WNT. Quand Wnt se lie au récepteur Frizzled, un signal est envoyé qui prévient la phosphorylation et la dégradation de la β caténine qui est accumulée dans le noyau, se lie au son partenaire LEF et active la transcription de ses gènes cibles.
D'après Owens et Watt, Nature Reviews Cancer 2003.

Il existe un lien entre les voies de signalisation Wnt et Hedgehog : quand la β caténine est surexprimée dans l'épiderme, la transcription de Shh est augmentée (Evans RD *et al.*, *J.Cell Biol.*, 2003 ; Watt FM, *Trends Mol.Med.*, 2004).

5.5. La voie Sonic Hedgehog

Shh intervient dans le développement et la régulation des CS. Les voies Shh et Wnt sont suractivées dans les tumeurs et sont nécessaires dans la croissance de

la tumeur. Les deux voies travaillent en synergie. Dans le cancer du colon Shh exerce un contrôle négatif sur Wnt. Shh peut être bloqué par la cyclopamine, molécule en développement pour les leucémies myéloïques chroniques, le myélome et le cancer de la prostate.

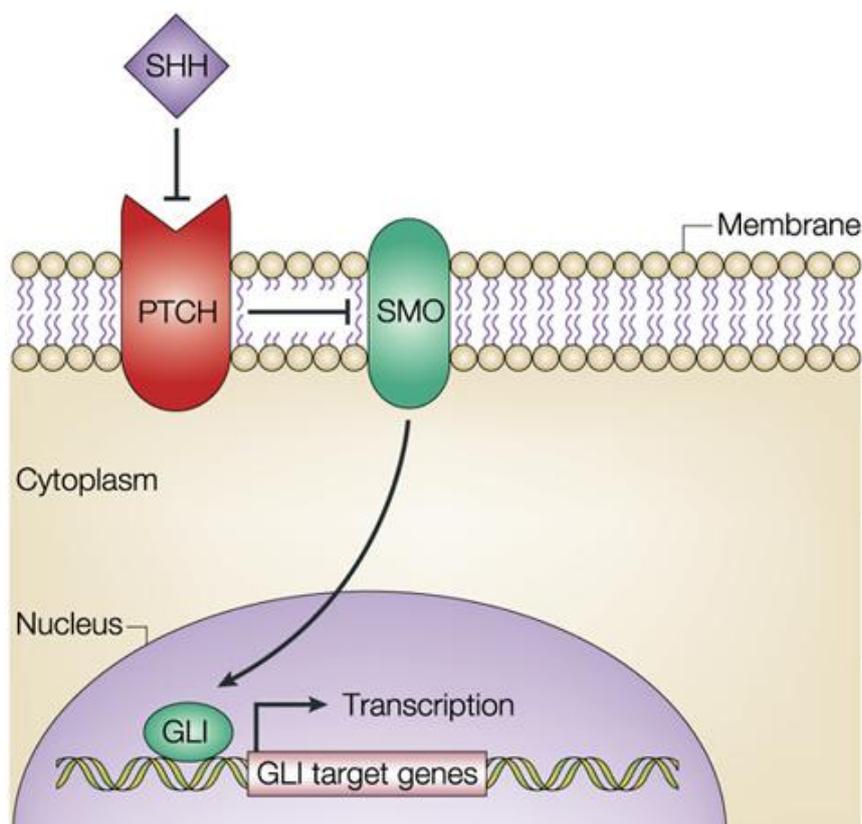


Figure 11 : La voie Sonic Hedgehog. Sonic Hedgehog (Shh) agit sur le complexe membrane-récepteur qui est formé par Patched (Ptch) et Smoothened (Smo) pour inhiber la répression de Smo par Ptch. Smo envoie des signaux intracellulaires pour activer Gli, puis la transcription de ses gènes cible.
D'après Owens et Watt, Nature Reviews Cancer 2003.

5.6. c-Myc

c-Myc joue un panel de rôles, à la fois au niveau de la niche donc dans les premières étapes de la décision cellulaire, comme dans la prolifération, la différenciation ou la migration des cellules.

Au niveau de la niche, c-Myc joue un rôle important dans les interactions entre les CS et le microenvironnement (Murphy MJ *et al.*, *TRENDS Cell Biol.*, 2005). Elle

est exprimée au niveau de la couche basale et du bulge. Elle fait partie des protéines qui influencent la division et l'auto renouvellement des CS. Soit c-Myc régule les mêmes gènes (du cytosquelette, intégrine) dans les deux cellules en train de se diviser symétriquement, puis la différenciation dépend du contexte. Soit l'activation de c-Myc est différente entre les deux cellules et induit que l'une reste souche alors que l'autre quitte la niche pour se différencier. (Watt FM *et al.*, *Nat.Rev.Cancer*, 2008).

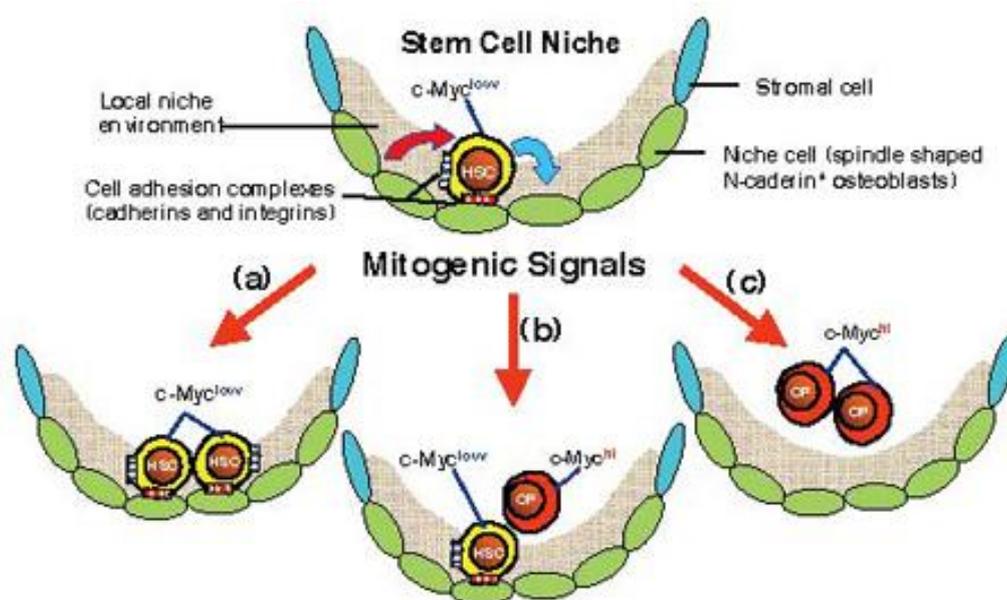


Figure 12 : Rôle de c-Myc dans la division des CS au sein de la niche.
D'après Andreas

Divers modèles de souris transgéniques ont été utilisés afin d'étudier précisément le rôle de cette protéine. La surexpression de c-Myc au niveau basal aboutit à une hyperplasie de l'épiderme et des glandes sébacées, au désavantage des follicules pileux. L'expression dérégulée de c-Myc diminue le nombre de CS au niveau de la couche basale (Waikel RL *et al.*, *Nat.Genet.*, 2001). c-Myc exprimé au niveau des couches suprabasales induit une hyperplasie épidermique, car les cellules post-mitotiques différenciées entrent à nouveau dans le cycle. C-Myc a donc un rôle important dans la régulation de la différenciation des CS épidermiques et la surexpression de c-Myc dans les CS épidermiques humaines stimule la différenciation plutôt que la prolifération. De plus, la migration cellulaire est perturbée, ce qui laisse supposer un rôle dans le contrôle de l'adhérence et de la migration en

relation avec la voie Wnt (Koster MI *et al.*, J.Investig.Dermatol.Symp.Proc., 2002 ; Murphy MJ *et al.*, Trends Cell Biol., 2005).

L'activité de Myc est affectée par de nombreux cofacteurs et des voies régulatrices (Watt FM *et al.*, Nat.Rev.Cancer, 2008). Les gènes cibles de c-Myc impliqués dans la régulation des CS restent mal connus. On sait que BLIMP1 est un répresseur transcriptionnel de Myc, impliqué dans la conversion des CS épidermiques en progéniteurs qui s'engageront dans la différenciation (Blanpain C et Fuchs E, Nat.Rev.Mol.Cell Biol., 2009). D'autre part, l'interaction de Myc et des facteurs d'hypoxie (HIF) dans les conditions physiologiques normales, non-tumorigéniques contribue à l'homéostasie cellulaire normale en réponse à un niveau faible d'oxygène (condition d'hypoxie). Beaucoup de tumeurs contiennent des altérations génétiques comme l'activation de Myc qui peut collaborer avec Hif pour apporter des avantages métaboliques aux cellules tumorales, tendant alors à sortir de l'environnement hypoxique (Dang CV *et al.*, Nat.Rev.Cancer, 2008). L'expression de Myc est dérégulée dans 30% des cancers humains.

Les mécanismes de régulation de la différenciation et de la quiescence sont étudiés indépendamment. Mais l'équilibre entre ces deux processus ainsi que les éléments pouvant faire basculer la balance vers l'un ou l'autre destin n'est pas clarifié.

Plusieurs protéines impliquées dans différentes voies de signalisation non spécifiques des CS ont été montrées comme importantes pour le maintien du nombre de CS (Orford KW et Scadden DT, Nat.Rev.Genet., 2008).

5.7. Les intégrines

Les intégrines ont un rôle dans la croissance et la migration via leur capacité à se lier directement au FAK (Focal Adhesion Kinase) et contrôler leur activité. Elles interviennent dans l'invasion et les métastases et contribuent au développement du carcinome épidermoïde. Les mutations ou la sur expression des intégrines peuvent augmenter le nombre de CS en inhibant l'apoptose et la différenciation. Un lien entre

l'expression des intégrines au niveau des cellules différenciées et la stimulation ou l'inhibition de la prolifération des cellules voisines des CS tumorales a également été mis en évidence (Evans RD *et al.*, *Cancer Lett.*, 2004).

L'intégrine $\beta 1$ joue aussi un rôle dans la division asymétrique des CS (Lechler T et Fuchs E, *Nature*, 2005) en générant une cellule exprimant fortement l'intégrine $\beta 1$, qui maintient le caractère de souche (« stemness ») et une cellule faiblement positive qui entre en différenciation terminale.

5.8. Rac 1

La GTPase de la famille de Rho, Rac1 peut aussi être impliquée dans le maintien des CS dans le bulge. L'isoforme $\Delta Np63$ joue un rôle dans le maintien du potentiel prolifératif des cellules épidermiques (Senoo M *et al.*, *Cell*, 2007).

5.9. Les kinases dépendantes des cyclines (CDK)

L'arrêt du cycle cellulaire fait intervenir l'augmentation de protéines inhibitrices du cycle cellulaire comme les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CDK). L'expression de ces inhibiteurs est suffisante pour que les cellules ne prolifèrent plus, mais leur expression ectopique ne récapitule pas la signature transcriptionnelle des cellules quiescente, suggérant que l'arrêt du cycle cellulaire et la quiescence cellulaire ne sont pas fonctionnellement équivalents. La quantité de p21, inhibiteur de CDK est augmentée dans les fibroblastes quiescents en réponse à une privation de sérum. P21 inhibe aussi l'activité de la cycline E-CDK2 et est une cible du gène suppresseur de tumeur p53. Si p21 est absent le nombre de cellules en G0 diminue, ce qui conduit à la perte totale des CS. L'expression de p21 a été montrée comme étant indispensable pour le maintien de l'auto renouvellement des CS leucémiques (Viale A *et al.*, *Nature*, 2009). Les mécanismes moléculaires impliqués sont cependant inconnus.

6.10. Pten

Le gène Pten, qui est codé par un régulateur négatif de PI3K, est un gène suppresseur de tumeur qui est communément trouvé dans les tumeurs humaines. Pten est nécessaire pour le maintien de la quiescence dans le compartiment des HSC. Quand Pten est perdu, les HSC entrent dans le cycle causant la perte de HSC en moins d'un mois.

5.11. FOXO

La famille des facteurs de transcription FOXO est connue pour réguler de nombreux processus cellulaires comme l'arrêt du cycle et la résistance au stress oxydatif. La délétion des facteurs foxo1, 3 et 4 engendre également une diminution du nombre de cellules primitives de HSC qui deviennent prolifératives et accumulent un taux élevé de ROS. Ceci implique donc que les ROS sont également des régulateurs de quiescence. Le rôle des mitochondries dans les CS est beaucoup discuté, surtout pour les CS adultes. Au niveau des CS embryonnaires, il a été montré que ces cellules possédaient moins de mitochondries et que la masse mitochondriale est plus faible que dans les cellules progénitrices ainsi qu'elles possèdent moins d'ADN mitochondrial. Les mécanismes faisant intervenir les mitochondries au sein des CS sont peu connus ([Loneragan T et al., Mitochondrion, 2007](#)).

Comme PI3K inhibe l'activité des membres de la famille FOXO et que Pten est un régulateur négatif de PI3K, alors Pten pourrait réguler la fonction des CS par l'activation indirecte des facteurs de transcription FOXO.

5.12. Hif1 α

L'hypoxie a un rôle pour les CS notamment la protéine Hif1 alpha. Elle est recrutée dans le complexe contenant le domaine intracellulaire de Notch pour les cellules hypoxiques et qui promeut la différenciation terminale des cellules souches

neurales et épidermiques. Les protéines Hif peuvent aussi moduler l'activité de c-Myc en jouant un rôle antagoniste ([Keith B et Simon MC, Cell, 2007](#)).

II. Les cellules souches dans le cancer

L'existence de points communs entre les cellules cancéreuses et les cellules souches somatiques a été soulignée depuis longtemps (Reya T et Clevers H, *Nature*, 2001). Les deux types de cellules possèdent la capacité de s'auto-renouveler, de manière finement régulée pour les cellules souches normales, de manière anarchique pour les cellules cancéreuses. Les deux types de cellules sont aussi capables de se différencier, de manière normale pour les cellules souches, de manière anormale ou incomplète pour les cellules cancéreuses. Dans ce modèle, un petit nombre de cellules souches tumorales est responsable du développement à long terme de la tumeur et donne naissance à de nombreuses cellules tumorales, proliférant plus ou moins rapidement. Ces cellules sont à l'origine de l'essentiel de la masse tumorale, mais ne présentent qu'un pouvoir tumorigène limité. Ce modèle de cellules souches tumorales s'oppose à la théorie clonale classique du cancer, dans laquelle toutes les cellules tumorales ont le même potentiel. Il a l'avantage de rendre compte de l'hétérogénéité morphologique et fonctionnelle observée depuis longtemps dans les tumeurs. Surtout, il ouvre des perspectives thérapeutiques totalement nouvelles, car il implique que les cellules souches sont la vraie cible thérapeutique qu'il faut viser pour vaincre le cancer, comme le montre la figure ci-dessous.

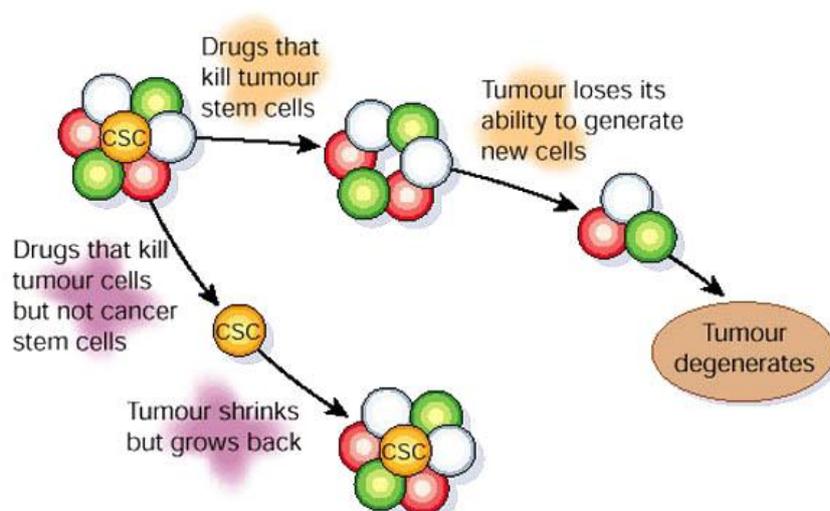


Figure 13 : Ciblage des CSC pour éradiquer une tumeur. D'après Reya, Morrison, Clarke et Weissman, *Nature*, 2001.

1. La mise en évidence de l'existence des cellules souches tumorales

La première preuve de l'existence des cellules souches cancéreuses a été publiée en 1997 par le groupe de John Dick ([Bonnet D et Dick JE, Nat.Med., 1997](#)). Ils ont isolé une sous-population de cellules leucémiques humaines qui expriment un marqueur de surface spécifique, CD34, et qui n'expriment pas du tout le marqueur CD38. Seules, les cellules CD34⁺/CD38⁻ sont capables d'initier une leucémie dans des souris NOD/SCID, avec reconstitution de l'hétérogénéité cellulaire de la tumeur de départ.

La découverte des cellules souches leucémiques a stimulé la recherche de cellules cancéreuses dans les tumeurs solides. Cette recherche a progressé assez lentement car les connaissances sur les cellules souches normales des tissus d'origine de ces tumeurs et sur leurs marqueurs étaient beaucoup moins avancées que pour les cellules souches hématopoïétiques. Des cellules souches cancéreuses ont été d'abord identifiées dans les tumeurs cérébrales ([Singh SK et al., Nature, 2004](#) ; [Singh SK et al., Cancer Res., 2003](#)) et le cancer du sein ([Al-Hajj M et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2003](#) ; [Vaillant F et al., Cancer Res., 2008](#) ; [Wicha MS, Breast Cancer Res., 2006](#)), puis dans un nombre croissant de tumeurs solides : cancer du colon ([Dalerba P et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2007](#) ; [Ricci-Vitiani L et al., Nature, 2007](#)), du pancréas ([Li C et al., Cancer Res., 2007](#)), de l'ovaire ([Honda A et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2007](#)), du foie ([Ma S et al., Gastroenterology, 2007](#)), de la prostate ([Collins AT et al., Cancer Res., 2005](#) ; [Lawson DA et Witte ON, J.Clin.Invest, 2007](#)), du poumon ([Eramo A et al., Cell Death.Differ., 2007](#)) et dans le mélanome ([Dou J et al., Cell Mol.Immunol, 2007](#) ; [Schatten T et al., Nature, 2008](#)). Le succès obtenu dans la mise en évidence de cellules souches tumorales dans un grand nombre de cancers a justifié la publication d'un numéro spécial du Journal of Clinical Oncology en 2008, pour faire le point des résultats obtenus ([Boman BM et al., J Clin Oncol, 2008](#)).

Dans tous ces cas, les « cellules souches tumorales » présentent des caractéristiques qui rappellent celles de cellules souches normales (phénotype immature, capacité d'auto renouvellement et de production de cellules différenciées) et sont seules capables de générer des tumeurs (et des neurosphères dans le cas

des tumeurs cérébrales) présentant la même hétérogénéité phénotypique que la tumeur de départ. Elles sont fractionnées en utilisant divers marqueurs membranaires, spécifiques des différents tissus concernés et souvent présentés par les cellules souches normales correspondantes (voir tableau ci-dessous).

Tumor	CSC phenotype	% Tumor cells with CSC immunophenotype	Tumors engrafting using sorted CSCs (1° Tx)	Min. CSCs to engraft (1° Tx)	Serial Tx performed	Min. CSCs or bulk tumor cells for serial Tx (2° Tx)	Ref.
AML	CD34 ⁺ CD38 ⁻	0.1-1	n/a	2 × 10 ⁵	No	—	20
AML	CD34 ⁺ CD38 ⁻	0.02-2	15/18	5 × 10 ³	Yes	2 × 10 ⁵ -2 × 10 ⁶ Bulk	19
AML	CD34 ⁺ CD38 ⁻	n/a	9/9	10 ³	Yes	10 ³ CSCs	69
Breast	CD44 ⁺ /CD24 ⁻ /low ^a	11-35	9/9	100	Yes ^b	200 CSCs	30
Medullo-blastoma	CD133 ⁺	6-21	3/3	10 ⁴	No	—	44
Glioblastoma	CD133 ⁺	19-29	4/4	100	Yes	10 ³ CSCs	44
HNSCC	CD44 ⁺	0.1-42.7	13/25	5 × 10 ³	Yes ^b	2.5 × 10 ⁴ CSCs	38
Colon	CD133 ⁺	1.8-24.5	11/17	100	Yes ^b	100 CSCs	47
Colon	CD133 ⁺	0.7-6.1	12/18	1,500	Yes ^b	n/a	48
Colon	CD133 ⁺	0.3-3.0	n/a	2.5-5 × 10 ³	Yes	n/a	48,49
Colon	ESAhi/CD44 ⁺	0.03-38.0	6/6 ^c	200	No	—	35
	ESAhi/CD44 ⁺ /CD166 ⁺⁺	1.2-16.0	3/3	150	Yes ^d	500 CSCs ^d	
Melanoma	ABC B5 ⁺	1.6-20.4	4/7	10 ⁵	Yes	10 ⁴ CSCs	53
Prostate	CD44 ⁺	0.1-20.0	2/2 ^e	10 ³	No	—	129
Pancreas	CD44 ⁺ CD24 ⁺ ESA ⁺	0.2-0.8	10/10 ^e	100	Yes ^b	n/a	36
Pancreas	CD133 ⁺	0.68-3.21	11/11	500	Yes ^b	500 CSCs	50
Lung (non-small cell)	CD133 ⁺	0.32-22	n/a	1 × 10 ⁴	No	—	51
Hepatocellular	CD44 ⁺ CD90 ⁺	0.74-6.2	13/13	5,000	Yes ^b	n/a	39
B-ALL	CD34 ⁺ CD10 ⁻	4.0-12.0	6/6	7 × 10 ⁴	Yes	10 ³ Bulk	61
	CD34 ⁺ CD19 ⁻	2.0-4.0	5/5	5 × 10 ⁴	Yes	10 ³ Bulk	
B-ALL (BCR-ABL ⁺ ETV6/RUNX1 ⁺)	CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD19 ⁺	0.17-4.51	8/10	5.5 × 10 ⁵ -9 × 10 ⁶	Yes ^b	n/a	46
T-ALL	CD34 ⁺ CD4 ⁻	5.0-15.0	6/7	10 ⁴	Yes ^b	3 × 10 ⁴ Bulk	62
	CD34 ⁺ CD7 ⁻	6.0-14.0	5/5	4 × 10 ³	Yes ^b	4 × 10 ³ Bulk	
Myeloma	CD138 ⁻ CD34 ⁻	n/a	1/1 ^f	1 × 10 ⁶	No	—	64

Abbreviations: 1°, primary; 2°, secondary; AML, acute myeloid leukemia; B-ALL, B-cell lymphoblastic leukemia; CSC, cancer stem cell; HNSCC, head-and-neck squamous cell carcinoma; Max, maximum; Min, minimum; n/a, not available; T-ALL, T-cell lymphoblastic leukemia; Tx, transplant.
^aLineage marker positive cells were also excluded. ^bTertiary and/or quaternary transplants also performed in addition to secondary transplants. ^cTransplants were performed using CSCs purified from primary xenografts. ^dP. Dalerba, personal communication.

Figure 14 : Tableau listant les cellules souches tumorales identifiées dans des tumeurs humaines.

Park et al., Mol Therapy, 2009.

Le pourcentage de cellules souches tumorales observées est généralement très faible, mais il peut être beaucoup plus élevé dans certaines tumeurs particulièrement agressives (glioblastome, mélanome, sein).

Des « cellules souches tumorales » semblent présentes en proportion variable (0 à 2%) dans des lignées cellulaires tumorales établies depuis des années. Démontrée pour la première fois dans une lignée de glioblastome de rat (Kondo T et

al., [Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2004](#)), leur existence est maintenant documentée dans un nombre croissant de lignées ([Haraguchi N *et al.*, Clin.Oncol., 2005](#)). Cette observation est très importante, car elle ouvre la voie à des recherches expérimentales sur des modèles faciles à manipuler. Nous l'avons mise à profit dans notre travail de thèse.

2. Les difficultés de définition et de caractérisation des cellules souches tumorales

2.1. La définition

En 2006, l'AACR a organisé un workshop sur les cellules souches tumorales où ont été discutées les questions de la définition et de l'origine des cellules souches tumorales ([Clarke MF *et al.*, Cancer Res, 2006](#)). Le consensus s'est fait pour définir les cellules souches tumorales comme les cellules de la tumeur qui ont la capacité de s'auto renouveler et de reproduire l'hétérogénéité de la tumeur d'origine, en particulier dans des expériences de xénogreffes, considérées comme le « gold standard » de la démonstration. Le terme de cellules souches tumorales fait ainsi référence au potentiel de ces cellules et pas à leur origine. C'est pourquoi, elles sont parfois appelées « cellules tumorigéniques » ou « cellules initiatrices de tumeurs ».

La première hypothèse sur l'origine des cellules souches tumorales était qu'elles dériveraient des cellules souches normales qui auraient seules la possibilité d'accumuler des mutations au cours de leur longue vie, et non des cellules progénitrices dont la durée de vie avant le passage à la différenciation terminale est très courte ([Owens DM *et Watt FM*, Nat.Rev.Cancer, 2003](#)). En fait, il semble que dans un certain nombre de cas (surtout des leucémies), les cellules souches tumorales peuvent provenir de cellules progénitrices qui auraient réacquis des propriétés de cellules souches après une mutation tardive ([Clarke MF *et al.*, Cancer Res, 2006](#) ; [Park CY *et al.*, Mol Ther., 2009](#)) Cette mutation conduirait à une réactivation des voies de contrôle de l'auto renouvellement. Plus généralement, le cancer pourrait provenir d'une expression inappropriée de programmes d'expression des gènes de type CS ([Wang Y *et Armstrong SA*, Cell Stem Cell, 2008](#)).

2.2. Les marqueurs

Une des difficultés majeures dans la caractérisation et le fractionnement des cellules souches cancéreuses des tumeurs solides est le manque de marqueurs spécifiques des cellules souches normales de leur tissu d'origine. Ceci explique les discordances parfois observées dans les résultats publiés dans la littérature. Un autre problème est celui de la variabilité de l'expression de ces marqueurs avec l'état fonctionnel des cellules, qui peut expliquer les résultats contradictoires obtenus avec un marqueur comme le CD133 par différentes équipes travaillant sur le même type de tumeur ([Visvader JE et Lindeman GJ., Nat.Rev.Cancer, 2008](#) ; [Jaksch M et al., Cancer Res, 2008](#)).

Aucun marqueur n'est absolu et les populations obtenues après utilisation d'un marqueur isolé sont souvent hétérogènes ([Hadgany A et al., Exp Cell Res, 2006](#)), c'est pourquoi il est recommandé d'utiliser une combinaison de marqueurs. Néanmoins les marqueurs disponibles permettent d'obtenir des enrichissements très significatifs en cellules souches tumorales.

2.3. Les xénogreffes

En l'absence de marqueur moléculaire absolu des cellules souches, la xénogreffe est considérée comme le « gold-standard ». Mais cette technique a ses propres limites bien discutées dans des revues récentes ([Visvader JE et al., Nat.Rev.Cancer, 2008](#) ; [Park CY et al., Mol Ther., 2009](#))

2.4. L'abondance variable des cellules souches tumorales

Certaines tumeurs (glioblastome, mélanome) peuvent présenter un pourcentage très élevé de cellules souches tumorales, ce qui a pu faire douter de la validité de l'hypothèse « cellules souches tumorales ». Mais ces tumeurs sont des tumeurs particulièrement agressives et pourraient être constituées principalement de cellules de type CS, sans que ceci remette en cause le modèle.

3. La signification médicale des cellules souches tumorales

Des résultats récents s'accumulent pour montrer que les cellules souches tumorales ont un intérêt médical, comme marqueur pronostique et comme cible thérapeutique.

3.1. Les cellules souches tumorales comme marqueur pronostique

Un pourcentage élevé de cellules souches tumorales au diagnostic semble être un facteur de mauvais pronostic dans plusieurs types de cancer : leucémie aigüe myéloblastique, cancer du sein, glioblastomes, cancers de la sphère ORL, tandis que la signature transcriptomique de cellules souches tumorales mammaires serait utilisable pour prédire l'évolution du cancer sein ([revu dans Park CY et al., Mol Ther., 2009](#)).

3.2. Les cellules souches comme cibles thérapeutiques

Les cellules souches tumorales apparaissent résistantes à la chimiothérapie conventionnelle et à la radiothérapie, comme il a été montré dans plusieurs modèles comme la leucémie aigüe myéloblastique, le cancer du sein et le glioblastome.

Plusieurs équipes ont cependant montré qu'il était possible de cibler les cellules souches tumorales dans divers modèles ([revu dans Park CY et al., Mol Ther., 2009](#)). Les cellules souches leucémiques et les cellules souches hématopoïétiques normales présentent une sensibilité différente à certaines combinaisons d'agents anticancéreux. Les cellules souches leucémiques pourraient également être ciblées en utilisant des inhibiteurs des voies qui inhibent l'apoptose. Le ciblage des voies Notch et BMP dans les tumeurs cérébrales et Shh dans le myélome apparaît prometteur. Enfin, l'utilisation d'anticorps ciblant ABCB5 dans le mélanome ou CD44 dans certaines leucémies donne des premiers résultats intéressants sur des modèles pré cliniques.

Lorsque je suis arrivée dans l'équipe de Renata Polakowska, peu d'études avaient été réalisées sur les CE de la peau humaine. Nous avons donc choisi une lignée de carcinome de peau humaine comme modèle pour tenter d'identifier les CE pouvant régir le développement du cancer.

C] EGFR

Le lignage épidermique débute par la division des cellules souches multipotentes dans le bulge et est contrôlé par la voie du récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGFR). Nous nous sommes donc demandé si l'expression de l'EGFR pourrait être corrélée avec le passage des cellules souches à la création du lignage épidermique, son rôle sur la division asymétrique des cellules souches ainsi que sur les cellules produites suite à cette division. Dans cette partie, nous introduirons donc brièvement les fonctions générales du récepteur en insistant sur son rôle dans l'épiderme.

I. Les récepteurs de la famille EGFR et ses ligands

1. La famille du récepteur EGFR

Le gène de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) ou récepteur du facteur de croissance épidermique est connu depuis longtemps. Il code une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs tyrosine kinase comptant 4 membres : egfr ou erbB1, erbB2 ou HER-2/neu (Human Epidermal Receptor), erbB3 ou HER-3 et erbB4 ou HER-4. Ces récepteurs sont exprimés dans de nombreux tissus d'origine mésodermique et ectodermique.

Les récepteurs de la famille de l'EGFR sont ancrés dans la membrane cytoplasmique et se composent de trois domaines. Ils possèdent un domaine extracellulaire riche en cystéine et subdivisé en 4 sous domaines (I, II, III, IV). Les domaines I et III sont impliqués dans la liaison des ligands alors que le domaine II est important dans l'interaction entre les récepteurs, indépendante des ligands. Une courte région hydrophobique transmembranaire relie le domaine extracellulaire à un domaine tyrosine kinase intra cytoplasmique, très conservé dans les récepteurs de la famille EGFR, possédant des résidus tyrosines qui sont phosphorylés suite à l'activation des récepteurs (Figure 15) (Hynes NE et Lane HA, Nat.Rev.Cancer, 2005).

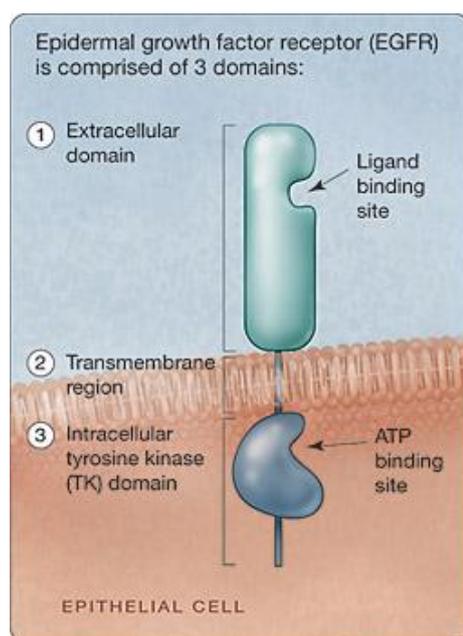


Figure 15 : Structure de l'EGFR. L'EGFR possède un domaine extracellulaire, une région transmembranaire et un domaine tyrosine kinase intracellulaire. *D'après Karamouzis, Grandis, Argiris, JAMA, 2007.*

2. Les ligands de l'EGFR

Les récepteurs de la famille EGFR partagent les mêmes ligands mais avec des affinités spécifiques à chaque récepteur. Ainsi l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF α (Transforming Growth Factor) et l'AREG (amphiréguline) s'attachent spécifiquement à l'EGFR alors que la BTC (betacelluline), l'HBEGF (héparine-binding EGF) et l'EREG (épiréguline) montrent une double spécificité de liaison pour EGFR et ErbB4 et que les NRG (neurégulines) ont la capacité de se fixer à ErbB3 et ErbB4 (NRG1 et NRG2) ou seulement à ErbB4 (NRG3 et NRG4). Aucun peptide ne se lie à ErbB2 c'est pourquoi on appelle ce récepteur un récepteur orphelin.

3. L'activation de la voie de l'EGFR

Le clivage de précurseurs transmembranaires par des protéases de surface aboutit à la libération de ligands solubles pouvant activer l'EGFR de la cellule d'origine (mode autocrine) ou de la cellule voisine (mode paracrine comme pour l'effet

des cellules mésenchymateuses sur les cellules épithéliales) (Singh AB et Harris RC, *Cell Signal.*, 2005 ; Schneider MR *et al.*, *Am.J.Pathol.*, 2008). Sans ligand, l'EGFR se trouve sous forme d'une structure fermée inactive, dans laquelle la dimérisation du domaine II est bloquée par les interactions intramoléculaires entre les domaines II et IV (Garrett TP *et al.*, *Mol.Cell*, 2003). Lorsque le ligand se lie, le domaine extracellulaire change de conformation et l'EGFR forme des homo ou hétérodimères (Figure 16) de récepteurs qui stabilisent le récepteur. Le domaine intracellulaire est ensuite phosphorylé au niveau de résidus de tyrosine ce qui active le récepteur. Ces résidus phosphorylés forment alors un site où sont recrutées certaines protéines, contenant les domaines Src Homology 2 (SH2) et Phosphotyrosine binding domaine (PTB) (Scaltriti M et Baselga J, *Clin.Cancer Res.*, 2006 ; Olayioye MA *et al.*, *EMBO J.*, 2000) qui vont ensuite activer des voies de signalisations intracellulaires.

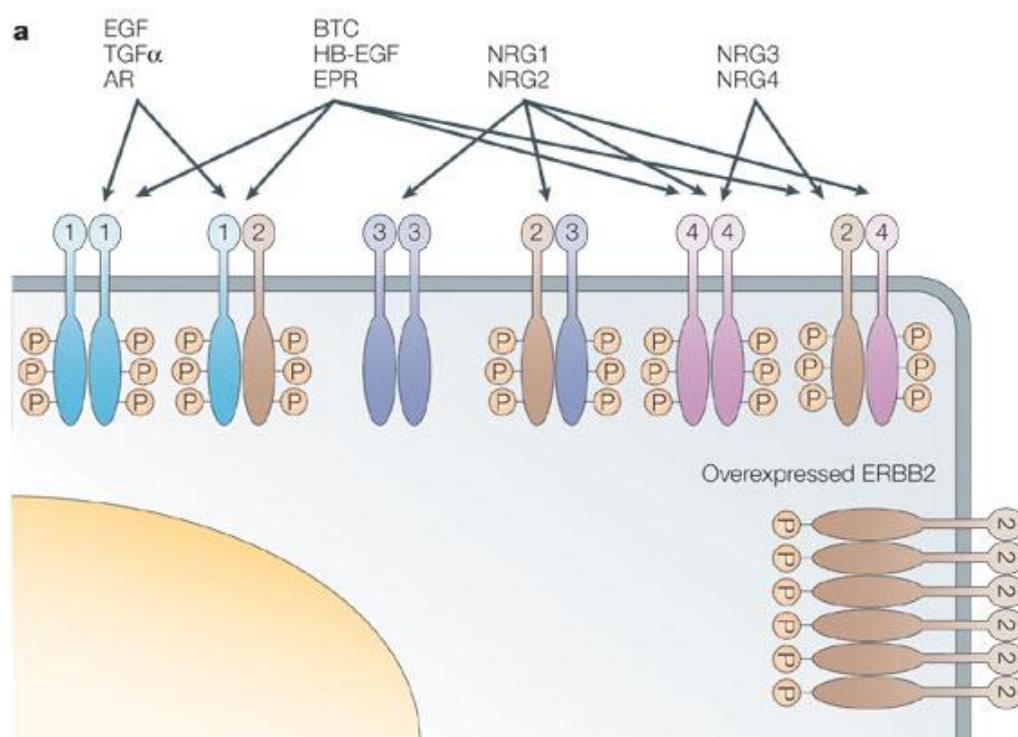


Figure 16 : Formation d'homo ou d'hétérodimères entre les récepteurs de la famille EGFR. Tous les ligands ne se fixent pas au même récepteur et induisent la dimérisation des récepteurs de façon spécifique *D'après Herbst, Fukuoka et Baselga, Nature Reviews Cancer, 2004.*

Le récepteur à l'EGF peut être également transactivé indépendamment des ligands, par la liaison de Wnt ou la voie des récepteurs couplés aux protéines G. Le mécanisme passe alors par la désactivation des phosphatases responsables de l'arrêt de fonction du récepteur (Scaltriti M et Baselga J, Clin.Cancer Res., 2006).

Le mécanisme d'activation des récepteurs de la famille de l'EGFR est maintenant bien connu mais la régulation de ce mécanisme n'est pas encore très claire. Pourtant elle présente un fort intérêt notamment pour comprendre les dérèglements dans le cancer de la peau.

II. Les cibles de l'EGFR et leurs voies de signalisation associées

Etant donné le large panel de fonctions de l'EGFR, nous nous restreindrons à son rôle au sein de l'épiderme.

Ainsi, dans les épidermes murin et humain, l'EGFR est fortement exprimé dans les kératinocytes indifférenciés prolifératifs des couches basales et suprabasales (Nanney LB *et al.*, J.Invest Dermatol., 1984 ; Nanney LB *et al.*, J.Invest Dermatol., 1990). Son expression diminue quand les kératinocytes quittent la couche basale, entrant en différenciation et migrant dans les couches suprabasales de l'épiderme. L'EGFR semble donc intervenir dans les différentes étapes qui participent à l'homéostasie tissulaire.

1. Le rôle de l'EGFR au stade embryonnaire

L'étude de l'EGFR par manipulations d'inactivation génique est difficile car peu de souris naissent ou vivent assez longtemps pour être étudiées. Ceci montre que l'EGFR est vital pour le développement animal avant son rôle spécifique dans l'homéostasie de la peau. Les souriceaux survivant (Schneider MR *et al.*, Am.J.Pathol., 2008) présentent un phénotype sévère d'atrophie épidermique et un taux extrêmement faible de kératinocytes proliférants. D'autres études montrent que

les follicules pileux de souris EGFR^{-/-} sont hyper prolifératifs mais subissent une différenciation prématurée et sont incapables de progresser normalement.

D'après Sibilias ([Sibilias M et Wagner EF, Science, 1995](#)), l'absence d'EGFR chez les souris conduit à la diminution de la taille des animaux (de 50 à 60%), au non développement des moustaches dès la naissance. La cornée des animaux est fine, ce qui marque l'absence de la différenciation. L'épiderme est fin, les couches de la peau ne sont pas distinguables et la couche cornée n'est pas kératinisée. En parallèle, la sur expression du récepteur conduit à un épaissement de l'épiderme ([Atit R et al., Dev.Cell, 2003](#)).

L'EGFR et les protéines qu'il active sont donc très importants pour la prolifération, la survie, la différenciation et l'apoptose des cellules épidermiques. Lorsque le récepteur est suractivé ou inhibé, les conséquences morphologiques dans les tissus normaux sont importantes et pourraient mener au développement de cancer. Il est essentiel de connaître parfaitement cette voie afin de détecter lorsqu'elle fonctionne mal.

2. La prolifération dépendante de la voie EGFR/MAPK

La prolifération cellulaire dans la couche basale épidermique est dépendante de l'EGFR, qui active la cascade bien connue des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) : MAPKKK (comme Raf-1)/MAPKK (comme MEK1 et 2)/MAPK (ERK, JNK et p38). Lorsque les MAPK sont activées, elles migrent dans le noyau où elles phosphorylent des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la survie cellulaires, comme AP-1 (Activator Protein-1). AP-1 est composé d'hétérodimères de protéines Fos et Jun ou d'homodimères de Jun. L'importance des protéines Jun est renforcée par l'existence d'une boucle de rétro activation entre Jun et EGFR et par leur rôle dans la formation tumorale. ([Zenz R et Wagner EF, Int.J.Biochem.Cell Biol., 2006](#)) ([Figure 17](#)).

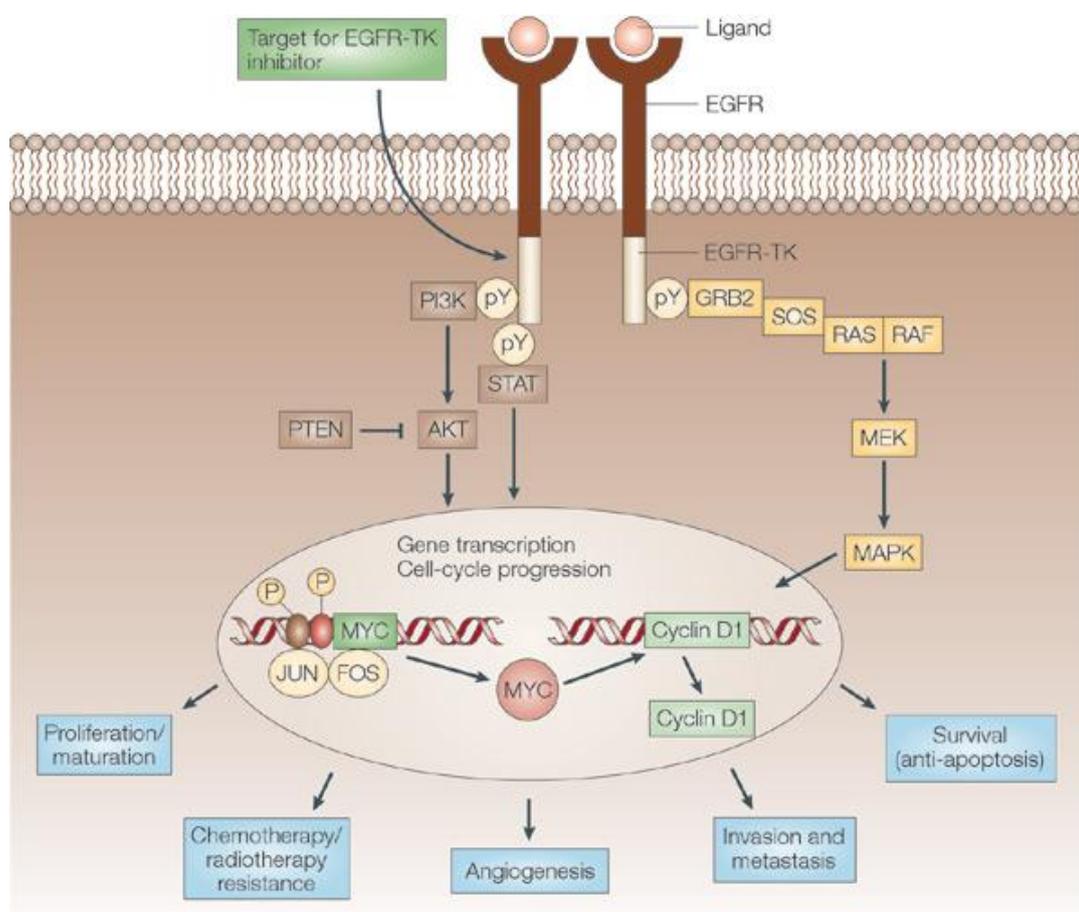


Figure 17 : Les voies induites par l'EGFR. L'EGFR induit de nombreux effets cellulaires selon la voie de signalisations qu'il active *D'après Herbst, Fukuoka et Baselga, Nature Reviews Cancer, 2004.*

Bien que la voie des MAPK soit aujourd'hui bien définie ([Khavari TA et Rinn J, Cell Cycle, 2007](#)), ses conditions d'activation restent encore insuffisamment comprises pour pouvoir anticiper les instants où la prolifération des cellules est active ou inactive et pouvoir détecter si la prolifération des cellules devient incontrôlée.

3. La balance entre la survie et l'apoptose dépend de la voie EGFR/PI3K

L'EGFR tend à stimuler la survie cellulaire et apporter une protection des cellules contre l'apoptose.

Rheinwald et Green ont montré que l'EGF exogène est nécessaire pour la survie à long terme des kératinocytes ([Rheinwald JG et Green H, Nature, 1977](#)). Plus

récemment, Rockert a montré que l'inhibition de l'EGFR pouvait induire une diminution de la croissance des kératinocytes de 50% à 90% en 5 jours, une impossibilité des cellules à ré-adhérer sur un support et une morphologie associée à l'apoptose (Rodeck U *et al.*, *J.Cell Sci.*, 1997). EGFR joue donc un rôle central entre l'adhésion, la survie et l'inhibition de l'apoptose.

La voie de survie, dépendante de l'EGFR, se fait via l'activation de la voie PI3K/Akt (Lacouture ME, *Nat.Rev.Cancer*, 2006). La sous unité régulatrice p85 de la PI3K permet l'ancrage de l'enzyme au récepteur EGFR, alors que la sous unité catalytique p110 génère un messenger secondaire (Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate), responsable de la phosphorylation de la protéine, sérine/thréonine kinase, Akt. Akt phosphoryle alors des facteurs pro-apoptotiques comme Bad ou des facteurs de transcription de la famille FKHRL1 qui sont transloqués de la mitochondrie ou du noyau respectivement au cytoplasme. Ces protéines alors inhibées conduisent à la survie des cellules comme les kératinocytes, à la croissance cellulaire, à la résistance à l'apoptose, à l'invasion et à la migration.

Lorsque l'EGFR est bloqué, les kératinocytes deviennent sensibles à la mort cellulaire, induite par des stress oxydatifs, ou par l'exposition aux UV (Stoll SW *et al.*, *Oncogene*, 1998). Ce phénotype d'apoptose fait intervenir les protéines STAT interagissant avec les résidus phosphotyrosine via leur domaine Src homology 2 et migrent au noyau où elles activent des gènes cibles spécifiques comme la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L (Grandis JR *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2000).

La voie de l'EGFR est donc essentielle à la survie des cellules et leur apporte une protection contre l'apoptose. On comprend bien qu'il ne faut pas que cette voie soit trop active car elle conduirait à un accroissement trop abondant du tissu.

4. La différenciation kératinocytaire dépend-elle de l'EGFR ?

Le rôle de l'EGFR dans la différenciation des kératinocytes est aujourd'hui controversé. D'abord considéré comme activateur de la différenciation, l'EGFR

semble maintenant pouvoir stimuler ou inhiber cette voie (Jost M *et al.*, *Eur.J.Dermatol.*, 2000).

Le traitement de kératinocytes avec l'EGF peut, selon les auteurs inhiber l'expression de marqueurs précoces de la différenciation terminale (K1, K10 et la transglutaminase de type 1) et la formation de l'enveloppe cornée (Monzon RI *et al.*, *Endocrinology*, 1996) comme dans les peaux reconstruites (Chen CS *et al.*, *J.Invest Dermatol.*, 1995). Mais d'autres équipes ont montré que l'inhibition de l'EGFR dans les kératinocytes en culture induisait aussi l'expression de K1 et K10 (Peus D *et al.*, *J.Invest Dermatol.*, 1997).

In vivo, l'expression de l'EGFR diminue dans les couches suprabasales de l'épiderme et pour certaines équipes des souris EGFR^{-/-} présenteraient une différenciation épidermique totalement parfaite (Hansen LA *et al.*, *Am.J.Pathol.*, 1997) alors que pour Miettinen *et al.*, la différenciation serait perturbée pour les mêmes souris (Miettinen PJ *et al.*, *Nature*, 1995).

Il semblerait donc que le rôle exact de l'EGFR dans la différenciation de l'épiderme soit encore incertain. Ceci pourrait s'expliquer par des effets compensatoires exercés par les autres membres de la famille de l'EGFR qui masqueraient le phénotype de différenciation épidermique dépendant de l'EGFR.

Le processus de différenciation débute par un arrêt du cycle cellulaire. Comment EGFR participe t-il à la régulation des différentes phases du cycle cellulaire ?

5. La régulation du cycle cellulaire par l'EGFR

L'EGFR régule la progression du cycle cellulaire des kératinocytes normaux par des mécanismes autocrines et paracrines (Vardy DA *et al.*, *J.Cell Physiol* 1995 ; Coffey RJ Jr *et al.*, *Cancer Res.*, 1987 ; Cook PW *et al.*, *J.Cell Physiol.*, 1991 ; Rheinwald JG *et al.*, *J.Cell Physiol.*, 1987).

La cascade MAPK/Cycline D1/Cdk4 et Cdk6 active p21 et phosphoryle Rb ce qui permet l'induction des évènements précoces de la phase G1 du cycle cellulaire (Bill HM *et al.*, *Mol Cell Biol.*, 2004). La deuxième partie de la phase G1, caractérisée

par la réduction de l'expression de p27, la production de la cycline A et l'activité de Cdk2, qui se complexe avec la Cycline E, est également dépendante de l'EGFR (Kobayashi T *et al.*, *J.Invest Dermatol.*, 1998) par l'implication de ses effecteurs Erk et PI3K. Myc est également activé dans cette étape.

L'entrée en phase S est sous le contrôle de l'EGFR puisqu'il a été montré que l'EGFR stimule la prolifération. Mais le mécanisme précis d'intervention est encore flou. On sait juste que les sites phosphorylés de l'EGFR dans la phase G1 et S sont différents. La surexpression de l'EGFR est suffisante pour induire l'entrée des cellules en phase S, sans pour autant avoir à ajouter d'EGF dans le milieu (Bill HM *et al.*, *Mol Cell Biol.*, 2004). Cette surexpression n'a cependant pas d'effet sur la voie Erk/CyclineD1 mais doit activer d'autres voies qui induisent l'expression de Myc, la dérégulation de p27, l'induction de l'activité de Cdk2, la phosphorylation de Rb et la synthèse de la Cycline A.

La phase G2/M est régulée par le complexe Cdk1/Cycline B mais aucun lien n'a été mis en relation avec la voie de l'EGFR. La même observation a été faite pour l'influence de l'EGFR sur la transition des cellules de la phase G0 et la phase G1, phase d'entrée dans le cycle cellulaire.

6. Le rôle dans la migration et la réparation de la peau suite à une blessure

Barrandon et Green ont été les premiers à montrer que l'EGF et le TGF α pouvaient stimuler la migration des kératinocytes normaux (Barrandon Y et Green H, *Cell*, 1987). La migration cellulaire est une étape obligatoire dans des processus physiologiques comme le développement et la cicatrisation. Pour cette dernière, les ligands de l'EGFR stimulent la migration latérale des kératinocytes pendant la ré-épithélialisation et donc accélèrent la réparation tissulaire (Ando Y et Jensen PJ, *J.Invest Dermatol.*, 1993). *In vivo*, 5 jours après une blessure, la ré-épithélialisation est complète et fait intervenir des mécanismes dépendants (Src/PI3K/STAT), ou indépendants de l'EGFR pour la migration des cellules et le comblement de la zone

lésée. Dans des souris déficientes en EGFR et suite à une blessure, la guérison est retardée ([Repertinger SK et al., J.Invest Dermatol., 2004](#)). Tout ceci montre que l'EGFR, en plus de son rôle dans l'homéostasie tissulaire normale, peut être stimulé pour réparer une zone endommagée en induisant l'inflammation, la contraction, la prolifération, la migration et l'angiogénèse.

Comme la migration est un mécanisme également impliqué dans les états pathologiques comme la formation de métastases, il est important d'étudier comment l'EGFR contrôle cette voie de migration. De même, il est important de savoir quand l'augmentation de la prolifération, suite à une blessure est arrêtée car ceci pourrait aboutir à de graves problèmes, comme le développement de tumeur.

III. L'EGFR et le cancer

Le cancer étant défini comme une hyperprolifération cellulaire incontrôlée et un défaut au niveau de la voie de différenciation, l'intérêt des chercheurs s'est focalisé sur le rôle de l'EGFR dans cette prolifération anarchique de cellules.

La formation des tumeurs de la peau est divisée en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression ([Bachelor MA et Bowden GT, Semin.Cancer Biol., 2004](#)). Toutes ces étapes peuvent être induites par les UVA et les UVB, causant des dommages à l'ADN liés à des stress oxydatifs ainsi qu'une augmentation de la transcription de gènes par l'activation de la voie de MAPK ([Bode AM et Dong Z, Sci.STKE, 2003](#)). EGFR ne semble pas essentiel pour l'initiation de la tumeur, mais il facilite son développement. Des études supplémentaires montrent qu'EGFR est nécessaire pour maintenir la population proliférative dans le compartiment de cellules basales. La déficience en EGFR induit la migration des cellules prolifératives dans les couches suprabasales et leur différenciation, associée à un arrêt du cycle cellulaire.

1. Les modifications de l'EGFR impliquées dans le cancer

EGFR a été le premier récepteur tyrosine kinase à avoir été mis en cause dans des tumeurs humaines. EGFR est impliqué dans le développement de nombreux cancers humains (Normanno N *et al.*, *Gene*, 2006). Il a été montré que les patients avec des altérations au niveau des récepteurs ont les maladies les plus agressives.

Dans les cellules cancéreuses, l'EGFR est constitutivement actif par plusieurs mécanismes, qui régulent normalement l'activité du récepteur (augmentation de l'expression des ligands, voie en aval de l'EGFR déficiente ou des interactions avec les Récepteurs Couplés aux Protéines G, les RTK ou des molécules d'adhésion). D'autre part, différentes altérations de l'EGFR sont rencontrées dans les cancers. On trouve :

- La surexpression du récepteur est associée à une pauvre survie (Schneider MR *et al.*, *Am.J.Pathol.*, 2008). Des études immuno-histochimiques ont montré que l'EGFR est détecté dans 50% des CBC (Carcinome Baso Cellulaire) et 100% des CE (Carcinome Epidermoïde).

- L'amplification du gène mène à la surexpression de l'EGFR. Cette amplification peut s'accompagner d'une réorganisation structurelle de la partie extracellulaire du récepteur et causer des délétions de cette partie dont la plus connue donne le variant EGFRvIII trouvé dans le gliome, et les cancers du sein, du poumon ou des ovaires (Batra SK *et al.*, *Cell Growth Differ.*, 1995). Le retrait des exons 1 à 7, correspondant au bras de dimérisation du domaine II, confère au récepteur son maintien en structure fermée, expliquant éventuellement l'activation constitutive du récepteur. Cette amplification a été trouvée dans 19% des cancers, dans 53% des CE de la tête et du cou (Krähn G *et al.*, *Eur.J.Cancer*, 2001) et dans la lignée cellulaire A431 que nous avons utilisée pour notre étude (Herr A *et al.*, *Genomics*, 2005).

- Des mutations somatiques dans le domaine tyrosine kinase intracellulaire de l'EGFR ont été identifiées dans les cancers du poumon à non petites cellules.

- Des mécanismes différents, incluant le blocage de la désactivation des phosphatases, l'altération de l'internalisation du récepteur et de sa dégradation, mènent à la prolifération kératinocytaire, la réduction de l'apoptose et l'hyperplasie épidermique.

L'EGFR est donc très important et est malheureusement répandu dans l'ensemble des cancers épithéliaux d'où la nécessité de comprendre comment il est modifié dans ces cancers et comment ces modifications peuvent induire le développement de cancer. Des études sur ce sujet sont en cours mais aucune ne permet de comprendre parfaitement les mécanismes mis en jeu.

L'altération de la voie EGFR au niveau des tumeurs perturbe tout le système qui régule l'homéostasie tissulaire. Comment sont envisagés les remèdes pour palier à ce problème ?

2. Le traitement anti-EGFR

EGFR peut être considéré comme un facteur de survie dans les cellules tumorales, rendant cette voie de signalisation une cible intéressante pour les interventions thérapeutiques (Schneider MA *et al.*, *Am.J.Pathol.*, 2008). De nombreuses équipes cherchent à développer des thérapies ciblant ce récepteur afin d'éradiquer les tumeurs mais les résultats ne sont pas encore satisfaisants. Deux classes principales de thérapie anti ErbB sont utilisées : les anticorps bloquant la conformation stabilisée du domaine extracellulaire, induite par la liaison du ligand au récepteur et les petites molécules inhibitrices de tyrosine kinase, qui entrent en compétition avec l'ATP pour le domaine tyrosine kinase intracellulaire.

2.1. Les anticorps bloquant la conformation stabilisée du domaine extracellulaire

Les anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement l'EGFR, comme le Cetuximab, se lient au domaine extracellulaire de l'EGFR en configuration inactive, entrent en compétition avec le ligand et occultent le site de liaison donc bloquent l'activité tyrosine kinase de l'EGFR induite par le ligand. Les cellules cultivées en la présence de cette molécule s'arrêtent alors en G1 due à l'élévation de la protéine p27^{KIP1}.

Le Cetuximab est maintenant dans la dernière phase clinique testé chez les patients avec un cancer colorectal ou de la tête et du cou. Le Panitumumab lui est en phase 3 pour le traitement du cancer colorectal métastatique.

2.2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase du domaine intracellulaire

Les petites molécules inhibitrices des tyrosine kinases de l'EGFR, comme Erlotinib ou Géfitinib, sont en compétition avec l'ATP pour le domaine catalytique intracellulaire et donc inhibent l'autophosphorylation de l'EGFR et la voie en aval. Ces molécules, contrairement aux anticorps, peuvent agir sur l'EGFR mais également sur le VEGFR ou les autres membres de la famille EGFR.

Parmi les inhibiteurs de kinase a été testé et validé l'Iressa (Gefitinib), utilisé pour le traitement du carcinome du poumon à non petites cellules, inopérable et récurrent ([Gschwind A et al., Nat.Rev.Cancer, 2004](#)). L'Erlotinib est lui aussi utilisé pour le traitement du cancer du poumon à non petites cellules ([Johnson JR et al., Clin.Cancer Res., 2005](#)).

2.3. L'insuffisance dans les résultats obtenus en thérapie

Bien que les avancées en termes de traitement des cancers où l'EGFR est altéré soient en constants progrès, aucune thérapie n'a présenté une efficacité idéale.

De plus, différents problèmes ont été rencontrés lors du traitement de malades. Les molécules utilisées, ciblant toutes les cellules qui expriment l'EGFR, y compris les cellules normales, de nombreux effets secondaires ont été observés (diarrhées, acnés). Il a même été nécessaire, dans certains cas, d'interrompre ou d'abandonner la thérapie du à des effets cutanés trop indésirables ([Lacouture ME et Melosky BL, Skin Therapy.Lett., 2007](#)).

Plusieurs explications ont été apportées pour expliquer l'insuffisance d'efficacité de ces traitements :

- L'EGFR peut subir plusieurs mutations à la fois et rendre difficile le ciblage des cellules cancéreuses,
- Tous les patients, ayant ou non des mutations de l'EGFR ne répondent pas aux traitements de la même façon ([Fukui T et al., Clin.Cancer Res., 2008](#)),
- Des mutations ou l'amplification d'autres oncogènes peuvent s'ajouter aux mutations de l'EGFR, comme par exemple K-RAS ([Van Krieken JH et al., Virchows Arch., 2008](#)) ou MET ([Jänne PA, Lung Cancer, 2008](#)). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'un tissu devient malin suite à l'acquisition de plusieurs mutations donc le traitement avec un agent qui agit sur une simple cible peut ne pas être suffisant ([Tortora G et al., Nat.Clin.Pract.Oncol., 2008](#)).

De nouvelles directions de développement de thérapie visent maintenant plusieurs voies intracellulaires. Par exemple, l'association de l'Erlotinib avec la Carboplatine ou le paxiclaixel prolonge la vie des patients. Pour le Cetuximab l'efficacité peut être améliorée par l'ajout de chimiothérapie basé sur le platine comme le cisplatine (ciblant l'ADN) ou la binorelbine ([Mehra R et al., Clin.Adv.Hematol.Oncol., 2008](#)).

Bien que l'efficacité de la bi-thérapie soit meilleure que la mono-thérapie, il reste encore des efforts à apporter afin d'accroître le nombre de patients définitivement guéris d'un cancer touchant un épithélium.

Pour notre part, nous sommes partis dans une direction totalement différente. Si le traitement anticancéreux, ciblant les cellules EGFR⁺, n'empêchent pas les rechutes après traitements, on peut supposer que la réapparition du cancer pourrait être due au fait qu'il reste des cellules non tuées par le premier traitement, qui se divisent pour donner une seconde tumeur. On pense donc que les cellules EGFR⁻ pourraient reconstruire un tissu et donc pourraient posséder les propriétés de cellules souches.

PARTIE II :

HYPOTHESES

ET

OBJECTIFS DE

THESE

Les hypothèses

L'épiderme est composé de différentes couches cellulaires correspondant chacune à un processus fonctionnel spécifique : prolifération et survie dans la couche basale, où se trouvent les cellules souches, différenciation précoce et survie dans les couches supra-basales, différenciation terminale et mort cellulaire dans la couche granuleuse, protection de l'organisme par les cellules mortes différenciées dans la couche cornée.

Au sein de la couche basale de l'épiderme normal, se trouve un microenvironnement appelé niche où sont logées les cellules souches qui restent quiescentes jusqu'à ce qu'un signal venant de la niche elle-même ou des cellules adjacentes stimule leur activité mitotique. Elles entrent alors dans le cycle cellulaire et se divisent asymétriquement, pour s'autorenouveler et garder en permanence un pool de cellules souches et pour produire une cellule d'amplification transitoire qui va se différencier. Cette dernière va d'abord se diviser 4-5 fois, puis quitter la couche basale pour entamer le processus de différenciation, qui a des propriétés partagées avec la voie bien connue de mort cellulaire par apoptose. Les éléments déterminant l'autorenouvellement des cellules souches ou la différenciation des cellules d'amplification transitoire étaient mal connus lorsque je suis arrivée dans l'équipe du Docteur Renata Polakowska. Nous avons donc cherché à comprendre quels mécanismes pouvaient réguler cet équilibre parmi les kératinocytes primaires de la peau humaine. Mon travail a été conçu pour tester l'hypothèse établie depuis longtemps par le laboratoire, selon laquelle l'engagement des cellules souches épidermiques à entrer en différenciation est lié à l'activation de la voie de mort cellulaire et que cela prend place dès que la cellule d'amplification transitoire apparaît. Cette hypothèse dit que les cellules souches, pour rester indifférenciées, réprimerait activement la machinerie de mort cellulaire par l'absence de récepteurs extracellulaires responsables de ce mécanisme. Un facteur qui est essentiel pour la croissance et la différenciation kératinocytaire est le facteur de croissance épidermique (EGF). Par conséquent, nous nous sommes appuyés sur des travaux antérieurs de notre laboratoire pour évaluer l'implication du récepteur à l'EGF dans le destin des cellules souches.

D'autre part, on sait que le cancer se caractérise par l'hyperprolifération des cellules et une voie de différenciation peu développée ou inexistante et que les cellules cancéreuses de la peau sur-expriment souvent le récepteur à l'EGF. Nous avons donc

utilisé une lignée de carcinome humain, les A431 comme modèle de travail et comparé les éléments qui régulent l'équilibre entre les cellules souches et les cellules qui vont se diviser parmi les kératinocytes normaux et issus de cette lignée.

Les objectifs

L'objectif à long terme de cette recherche est de fournir des bases scientifiques pour le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses ciblant spécifiquement les cellules souches cancéreuses que l'on croit responsables de la croissance tumorale. Il est envisagé qu'en éradiquant les cellules souches cancéreuses, mère de toutes les cellules de la masse tumorale et en épargnant les cellules souches normales, la tumeur dégènerait et le cancer serait guéri, sans effets secondaires sur les tissus normaux. Pour atteindre ce but à long terme, nous avons concentré notre effort sur des objectifs plus spécifiques :

- I. Le plus important, mais le plus ambitieux de mon étude était d'identifier, d'isoler et de caractériser les cellules souches dans la peau humaine normale et dans des tumeurs de peau. Plusieurs marqueurs ont été suggérés pour identifier les cellules souches de l'épiderme normal mais aucun n'était connu pour discriminer les cellules souches cancéreuses. Cet objectif a été mené à terme et nous avons établi (par cytométrie en flux, video-microscopie, tri cellulaire par immunofluorescence et des analyses de clonogénicité et d'autorenouvellement de cellules fraîchement isolées à partir de peaux normales et cancéreuses aussi bien que sur une lignée cellulaire cancéreuse) que les cellules EGFR⁻ et Rhodamine 123⁻ ont un profil phénotypique et fonctionnel de cellules souches.
- II. Le second objectif était de déterminer le profil moléculaire des cellules EGFR⁻ et EGFR⁺ dans le but d'établir le rôle de l'EGFR dans le contrôle du destin des kératinocytes à travers leur lignage. Nos données de puces à ARN et de Western Blot ont permis d'identifier une signature moléculaire des cellules EGFR⁻ et EGFR⁺ permettant de conclure que l'acquisition de l'EGFR à la surface cellulaire corrèle avec le phénotype plus différencié. Ceci suggère que l'EGFR peut fonctionner comme un gardien de l'engagement cellulaire à quitter le compartiment des cellules souches et entrer dans le compartiment de différenciation.

PARTIE III :

RESULTATS

A] Asymmetric Distribution of Epidermal Growth Factor Receptor Directs the Fate of Normal and Cancer Keratinocytes *in vitro*

(publié dans Stem Cells and Development)

H. Le Roy, T. Zuliani, I. Wolowczuk, N. Faivre, N. Jouy, B. Masselot, J-P. Kerkaert, P. Formstecher, R. Polakowska

L'homéostasie des tissus en renouvellement constant est régulée par une petite fraction de cellules, appelées Cellules Souches (CS). Ces cellules indifférenciées se divisent asymétriquement pour s'autorenouveler et générer des cellules qui se différencient pour reformer le tissu éliminé au fur et à mesure. L'existence de ces CS a également été montrée dans les tissus cancéreux. La division asymétrique des CS est contrôlée par différents facteurs, comme des récepteurs membranaires. Puisque l'EGFR est un régulateur majeur de l'homéostasie épidermique, en influençant la prolifération, la différenciation, la survie et la migration des kératinocytes, nous nous sommes intéressés au rôle de l'EGFR dans le destin des CS et des cellules qui se différencient dans l'épiderme normal. Nous avons tenté de trouver quel avantage les cellules cancéreuses de la peau ont à suractiver leur EGFR soit par amplification ou par mutation.

Pour répondre à cette question, nous avons choisi comme modèle une lignée de carcinome épidermoïde humain, les A431. Nous avons utilisé des kératinocytes humains normaux (KHN) de l'épiderme comme contrôle, afin de visualiser ce qui diffère du tissu normal et mieux comprendre le tissu anormal. La comparaison des résultats, obtenus à partir de cellules isolées de tumeurs extraites de patients, nous a permis de tirer des conclusions générales. Le résultat le plus intrigant, mais qui a apporté la direction à suivre pour notre étude, a été l'observation d'une distribution asymétrique de l'EGFR lorsque des cellules normales ou issues de cancer de la peau humaine se divisent. Ceci suggère que l'EGFR a un rôle dans la détermination du destin des kératinocytes.

L'analyse phénotypique et fonctionnelle des kératinocytes normaux et cancéreux a révélé que des cellules dépourvues d'EGFR à leur surface cellulaire, étaient

présentes dans les deux populations cellulaires et qu'elles avaient des caractéristiques de cellules souches. Le pourcentage de cellules EGFR⁻ est faible à la fois parmi les kératinocytes normaux et dans la lignée cancéreuse A431. Ces cellules sont petites, peu granuleuses et excluent la Rhodamine 123, formant une « side population », caractéristiques des CS. En parallèle, nous avons montré que les cellules A431 EGFR⁻ sont plus clonogéniques que les cellules EGFR⁺ et forment des colonies de grande taille, caractéristique utilisé comme critère d'identification des CS. De même, ces différentes cellules mises en culture sont capables de se diviser de façon asymétrique afin de produire des cellules EGFR⁺ mais également permettre un retour à la proportion initiale entre les cellules EGFR⁻ et EGFR⁺, reconstruisant ainsi l'hétérogénéité d'origine, observée en culture. La culture des cellules dans des conditions spécifiques de formation de sphères, a révélé que dans ces conditions la population de cellules EGFR⁻ est amplifiée et facilite la formation de sphères secondaires.

L'analyse phénotypique des cellules EGFR⁻ et EGFR⁺, a montré que les KHN EGFR⁻ présentent un phénotype CD44⁺CD95⁻, alors que les EGFR⁺ sont CD44⁻CD95⁺. Par contre, les A431 EGFR⁻ et EGFR⁺ ne présentent pas de différences de phénotypes et sont CD44^{low}CD95⁻, montrant la différence d'acquisition de l'EGFR et des deux autres marqueurs. L'expression des protéines membranaires est donc différemment régulée dans les tissus normaux et cancéreux et les cellules cancéreuses pourraient acquérir leur immortalité et perdre leur capacité à se différencier à ce stade. Comme les cellules EGFR⁺ sont CD95⁺, deux marqueurs trouvés dans les compartiments prolifératifs et de différenciation précoce de l'épiderme normal, nous avons accumulé des preuves soutenant l'idée que le passage du phénotype EGFR⁻ à EGFR⁺ contrôle l'engagement des cellules souches épidermiques dans la différenciation, précédée par une rapide prolifération.

Après séparation des cellules EGFR⁻ et EGFR⁺ par FACS, nous avons réalisé une étude des gènes et des protéines différemment exprimées dans les différentes fractions. Il en ressort que les cellules EGFR⁻ expriment principalement des gènes impliqués dans l'hypoxie, dans la régulation du stress oxydatif. Par opposition, les cellules EGFR⁺ expriment d'avantage des gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires. De façon intéressante, nous avons identifié des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire étant différemment exprimés dans les cellules normales et les cellules cancéreuses. L'étude du cycle cellulaire de chaque

fraction a révélé que les cellules normales EGFR⁻ sont quiescentes alors qu'il existe une fraction de cellules en phase S au sein des cellules A431 EGFR⁻ pouvant expliquer l'hyperprolifération des cellules cancéreuses indépendante de la signalisation EGFR.

Ainsi, nos résultats ont montré (i) que l'EGFR est asymétriquement distribué dans les kératinocytes en division et pourrait être un déterminant du destin des cellules épithéliales (ii) que les cellules dépourvues en EGFR à leur surface ont des propriétés de CS. Puisque les cellules souches « Side Population » excluent la Rhodamine 123 ([Radley JM et al., Exp.Hematol., 1999](#)) et que nous avons trouvé que la sous-population Rhodamine 123⁻ comprend des cellules EGFR⁺ et EGFR⁻, nous proposons un modèle dans lequel les cellules EGFR⁻ Rhodamine 123⁻ sont quiescentes et se divisent peu fréquemment pour s'autorenouveler et produire une cellule fille qui se divise pour produire une population de cellules EGFR⁺ Rhodamine 123⁺ destinées à se différencier et à mourir. Dans ce scénario, les cellules EGFR⁺ Rhodamine 123⁻, que l'on pourrait associer à une catégorie de CS actives, sont transitoires et plus nombreuses dans les A431. Les différences observées au niveau de l'expression de protéines impliquées dans la régulation de la biologie de la mitochondrie et du taux oxydatif de la cellule tel que Hif-1a et PGC-1a, révèlent que ces deux éléments (mitochondrie et ROS) sont primordiaux pour contrôler la quiescence et la différenciation des kératinocytes. Par ailleurs, nous avons observé des différences entre les cellules EGFR⁻ des KHN et de la lignée A431 au niveau de la sous-population excluant la Rhodamine 123, au niveau de l'expression de marqueurs de CS à la surface et au niveau de protéines régulatrices du cycle cellulaire qui peuvent expliquer la cinétique accélérée des cellules cancéreuses.

Asymmetric Distribution of Epidermal Growth Factor Receptor Directs the Fate of Normal and Cancer Keratinocytes In Vitro

Hélène Le Roy,¹ Thomas Zuliani,¹ Isabelle Wolowczuk,^{2,3} Nathan Faivre,¹ Nathalie Jouy,⁴ Bernadette Masselot,^{1,5} Jean-Pierre Kerkaert,^{1,4,6} Pierre Formstecher,^{1,5,7} and Renata Polakowska^{1,5}

Cancer cells are unequal in a tumor mass and in established cultures. This is attributable to cancer stem cells with the unique ability to self-renew and to generate differentiating progeny. This ability is controlled at the level of asymmetric division by mechanisms that are yet not well defined. We found that normal and cancer keratinocyte fate was linked to the asymmetric distribution of epidermal growth factor receptor (EGFR) during mitosis. Although essential for epithelial cell proliferation, differentiation, and survival, this receptor was not present on the surface of cells satisfying criteria for stem cells such as quiescence, competence to produce functionally distinct daughters, high proliferative and clonogenic potential, sphere formation ability, and expression of stem cell markers. In contrast, keratinocytes displaying EGFR acquired a more differentiated phenotype, suggesting that EGFR may be involved in a switch from stem to transient amplifying cell fate. This switch was associated with changes in the expression profile of cell cycle, survival, and mitochondria controlling proteins that varied between normal and cancer cells. In conclusion, it appears that an unequal distribution of EGFR at mitosis controls keratinocyte fate by balancing quiescence and cycling of EGFR⁻ cells, clearly malfunctioning in cancer. We believe that our findings provide mechanistic insights into the development of resistance to anti-EGFR therapies.

Introduction

THE CELLULAR HOMEOSTASIS OF any adult tissue is maintained by a small subpopulation of undifferentiated and long living stem cells. These cells divide asymmetrically to reproduce self and to generate committed progenitor cells that are able to replace terminally differentiated, lost, and damaged cells of the tissue [1]. In addition to this fundamental role in tissue homeostasis and a contrario substantiating it, numerous findings reveal aberrant maintenance and function of stem cells in cancers [2-5]. Indeed, accumulating data provide evidence that development of hematopoietic and solid tumors relies on a small population of cancer cells known as cancer stem cells or tumor-initiating cells. These cells have the capacity to reinstate tumor growth and recapitulate the cellular heterogeneity of the original tumor mass as a result of their self-renewing and differentiating

abilities [6]. In normal tissue, these dual abilities, unique to stem cells, are functionally uncoupled at the level of cell division by mechanisms controlling the production of 2 uneven cells and involving unequal distribution of molecular determinants of cell fate, cell polarity, mitotic spindle orientation, and, as recently documented, unequal distribution of surface receptors [2,7]. Along this line, unequal abundance of surface epidermal growth factor receptor (EGFR) was shown to specify asymmetry in cell fate of a subset of dividing embryonic murine cortical cells in response to environmental signals [8].

EGFR is a member of the ErbB family expressed in neuronal, epithelial, and mesenchymal cells where it plays critical roles in proliferation, differentiation, and apoptosis [9-11]. In the epidermis, EGFR is responsible for maintaining the epidermal phenotype. Its strong expression is confined to

¹INSERM U837, JPA Research Center, Lille Cedex, France.

²Laboratoire de NeuroImmunoEndocrinologie, Institut Pasteur de Lille, Lille, France.

³IFR 142, Institut Pasteur, Lille Cedex, France.

⁴Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille, Lille Cedex, France.

⁵Université Lille 2, Faculté de Médecine, Lille Cedex, France.

⁶IFR114-IMPRT, Lille Cedex, France.

⁷CHRU, Lille, Centre de Biologie Pathologie, Lille Cedex, France.

B] Présentations de posters aux congrès

1. Des cellules souches à la mort cellulaire : Implication de la protéine adaptatrice p66^{Shc} dans le processus de différenciation des kératinocytes de la peau humaine

Le Roy H, Estienney M, Zuliani T, Obriot H, Tual M, Formstecher P, Polakowska R
7^e Journée André Verbert, Septembre 2007, Faculté de Médecine, Lille

p66^{Shc} est un relais moléculaire entre le récepteur à l'EGF activé et la voie des MAPK conduisant à la prolifération cellulaire. Dans sa forme phosphorylée (sérine 36), p66^{Shc} possède des fonctions particulières, notamment elle inhibe la prolifération cellulaire. Elle induit également la phosphorylation du facteur de transcription FOXO3A impliqué à la fois dans la survie et la mort cellulaire. Elle sert aussi de régulateur de la production des ROS (reactive oxygen species) qui activent la mort cellulaire et, récemment trouvé au sein du laboratoire, accompagne la différenciation des kératinocytes de la peau humaine. La peau est un tissu stratifié en renouvellement constant dont l'homéostasie, équilibre entre prolifération et mort cellulaire, est contrôlée par les cellules souches. Celles-ci se divisent de façon asymétrique pour conserver un pool de cellules souches d'une part et engendrer la formation du tissu d'autre part en initiant un programme de différenciation.

L'hypothèse du laboratoire est que p66^{Shc} pourrait contrôler chaque étape de la différenciation des kératinocytes de la division asymétrique de cellules souches à la mort finale des cellules progénitrices.

La première étape de ce travail a été l'identification des cellules souches de la peau. Pour cela nous avons utilisé la non expression de l'EGFR comme marqueur éventuel de cellules souches et tenté de faire corrélérer cette non expression avec d'autres marqueurs connus de cellules souches. Nous avons trouvé que les kératinocytes primaires CD44⁺ et CD95⁻ corrèlaient avec les cellules EGFR⁻ et que ces expressions corrélées étaient altérées dans la lignée cancéreuse A431.

Après séparation des cellules EGFR⁺ et EGFR⁻, nous avons pu mettre en évidence une expression asymétrique de l'EGFR de cellules EGFR⁻ en division et une clonogénicité

plus élevée des cellules EGFR⁻ par rapport aux cellules EGFR⁺, critères retenus pour caractériser les cellules souches.

L'étude des gènes différemment exprimés dans les deux fractions nous a laissé penser que les cellules EGFR⁻ exprimeraient davantage des gènes de la famille TRAF/TNFR/NFκB aboutissant à la survie cellulaire alors que les cellules EGFR⁺ exprimeraient les gènes des protéines anti-apoptotiques. Il existerait donc un équilibre entre la vie et la mort contrôlé par EGFR et éventuellement p66^{Shc} dû à son expression minorée dans les cellules EGFR⁻ et son effet sur les protéines de l'apoptose. Cette balance était dérégulée dans les cellules cancéreuses d'où un intérêt particulier pour le rôle de p66^{Shc} dans les peaux normales et cancéreuses.

Dans la peau normale, l'expression de p66^{Shc} était liée à l'activité proliférative des cellules basales et à la différenciation des cellules des couches supérieures. L'expression nucléaire de la forme phosphorylée de p66^{Shc} sur la sérine 36 corrélait avec la différenciation et la mort des cellules. Dans la peau tumorale, p66^{Shc} phosphorylée n'était pas exprimée, sans doute parce que la cancérisation inhiberait la différenciation des cellules.

Nous avons retrouvé l'implication de p66^{Shc} dans la prolifération des cellules A431 et noté que celle-ci était accrue dans les cancers en liaison avec l'absence de la forme phosphorylée de p66^{Shc}. La différenciation cellulaire débute par un arrêt irréversible du cycle cellulaire, lié à la co-expression de p53 et p66^{Shc} phosphorylée dans les kératinocytes normaux. Cet arrêt du cycle en G1 et la stimulation de la différenciation dépendent à la fois de p66^{Shc} et des ROS, qui entraînent ensuite l'apoptose des cellules.

En conclusion, il existerait des différences d'expressions phénotypiques, géniques et protéiques entre les cellules souches normales et cancéreuses de la peau. p66^{Shc} jouerait un rôle important dans chaque étape de la différenciation des cellules de la peau normale. Ses fonctions, via sa forme phosphorylée, sont perturbées dans les cellules cancéreuses. p66^{Shc} aurait donc une place primordiale dans la compréhension des mécanismes de cancérisation de la peau humaine.

2. Epidermal Growth Factor Receptor distinguishes between stem and transient amplifying cell fate in squamous cell carcinoma cells line

Le Roy H, Zuliani T, Hamiche S, Ould-Aklouche M, Bernard M, Vaudry D, Formstecher P, Polakowska R

20^e EACR 20, 5-8 Juillet 2008, Lyon

Les cellules cancéreuses sont phénotypiquement et fonctionnellement hétérogènes au sein de la masse tumorale comme en culture. Ceci serait dû à une petite sous-population de cellules cancéreuses qui possèdent des propriétés attribuées uniquement aux cellules souches pour générer une descendance différenciée et maintenir leur propre nombre. La régulation de cette double capacité est contrôlée au niveau de la division asymétrique des CS par des mécanismes qui sont, jusque là, peu définis. Nos résultats ont suggéré que dans la lignée de carcinome épidermoïde, le destin des cellules cancéreuses était lié au taux d'expression et à la distribution sub-cellulaire du récepteur à l'EGF (EGFR). De façon intéressante, bien qu'essentiel pour la prolifération, la différenciation et la survie des cellules épithéliales, ce facteur n'a pas été retrouvé à la surface des cellules répondant à des critères de cellules souches comme la division asymétrique, un potentiel clonogénique élevé, l'expression de marqueurs de cellules souches et un profil de migration. Nous avons déterminé que l'EGFR pouvait être asymétriquement distribué durant la division et nous avons identifié plusieurs gènes contrôlant le cycle cellulaire, la voie TNF, la survie, l'activité mitochondriale et l'auto-renouvellement qui seraient différemment régulés dans les cellules EGFR⁻ et EGFR⁺ et dont l'expression différerait entre les cellules normales et les cellules de carcinome épidermoïde. Nos données ont donc suggéré que l'EGFR pourrait être un déterminant important du destin cellulaire et permettrait le passage d'un phénotype de cellules souches à celui de cellules engagées dans la différenciation. Cette détermination se ferait durant la division asymétrique des CS et les gènes associés à ce transfert seraient différents entre les cellules souches normales et cancéreuses.

3. Epidermal Growth Factor Receptor Distinguishes Between Stem and Transient Amplifying Cell Fate in a Squamous Cell Carcinoma Cell Line

Le Roy H, Zuliani T, Tual M, Formstecher P, Polakowska R

Congrès Annuel de Recherche Dermatologique, 3-5 Juin 2009, Reims

Les cellules cancéreuses sont phénotypiquement et fonctionnellement hétérogènes au sein de la masse tumorale comme en culture. Ceci serait dû à une petite sous-population de cellules cancéreuses qui possèdent des propriétés attribuées uniquement aux cellules souches pour générer une descendance différenciée et maintenir leur propre nombre. La régulation de cette double capacité est contrôlée au niveau de la division asymétrique des CS par des mécanismes qui sont, jusque là, peu définis. Nos résultats ont suggéré que dans la lignée de carcinome épidermoïde, le destin des cellules cancéreuses était lié au taux d'expression et à la distribution sub-cellulaire du récepteur à l'EGF (EGFR). De façon intéressante, bien qu'essentiel pour la prolifération, la différenciation et la survie des cellules épithéliales, ce facteur n'a pas été retrouvé à la surface des cellules répondant à des critères de cellules souches comme la division asymétrique, un potentiel clonogénique élevé, l'expression de marqueurs de cellules souches et un profil de migration. Nous avons déterminé que l'EGFR pouvait être asymétriquement distribué durant la division et nous avons identifié plusieurs gènes contrôlant le cycle cellulaire, la voie TNF, la survie, l'activité mitochondriale et l'auto-renouvellement qui seraient différemment régulés dans les cellules EGFR⁻ et EGFR⁺ et dont l'expression différerait entre les cellules normales et les cellules de carcinome épidermoïde. Nos données ont donc suggéré que l'EGFR pourrait être un déterminant important du destin cellulaire et permettrait le passage d'un phénotype de cellules souches à celui de cellules engagées dans la différenciation. Cette détermination se ferait durant la division asymétrique des CS et les gènes associés à ce transfert seraient différents entre les cellules souches normales et cancéreuses.



Epidermal Growth Factor Receptor Distinguishes Between Stem and Transient Amplifying Cell Fate in a Squamous Cell Carcinoma Cell Line

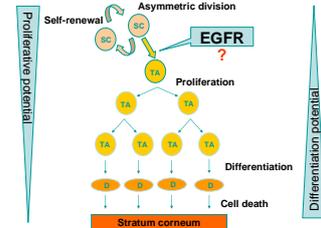
Le Roy H., Zuliani T., Tual M., Formstecher P., Polakowska R.

INSERM U837, Faculté de Médecine Pôle Recherche Université Lille 2, 1 Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, FRANCE

ABSTRACT

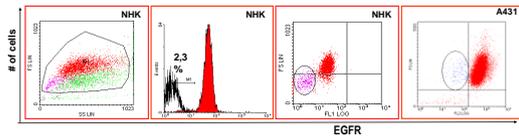
Cancer cells are phenotypically and functionally unequal in a tumor mass and in established cultures. This is attributable to a small subpopulation of cancer cells which have the unique ability of stem cells to generate differentiating progeny while maintaining their own number. Regulation of this dual ability is controlled at the level of asymmetric division by mechanisms that are, as yet, not well defined. Our findings suggest that in the squamous cell carcinoma (SCC) cell line A431, the fate of cancer cells is linked to the expression level and sub-cellular distribution of epidermal growth factor receptor (EGFR). Interestingly, though essential for epithelial cell proliferation, differentiation and survival, this factor was not found on the surface of cells that satisfy criteria for stem cells, including asymmetric division, high clonogenic potential and expression of stem cell markers. We determined, that EGFR can be asymmetrically distributed during cell division and identified several controlling genes, such as those associated with cell cycle, TNF-pathway, survival, mitochondria and self-renewal. These genes were differentially regulated in EGFR-negative and EGFR-positive cells and in cancer and normal tissue cultures. Our data suggest that EGFR may be an important cell fate determinant which controls a switch of stem cell to transient amplifying cell phenotype during asymmetric division, and that the set of genes associated with this switch is different for normal and cancer stem cells.

The proliferative hierarchy and differentiation in human epidermis: The stem cell and epidermal proliferative unit concept



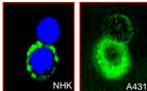
RESULTS

1. Epidermis contains a small subpopulation of EGFR negative (EGFR⁻) cells



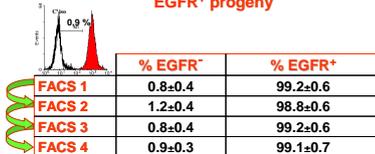
Stem cells are rare and undifferentiated. Flow cytometry of human epidermal keratinocytes labeled with FITC conjugated anti-EGFR antibody distinguished a small subpopulation of cells that did not react with this antibody. These cells were of low forward scatter (FS) and side scatter (SS) reflecting the undifferentiated character of EGFR⁻ cells, attributed to stem cells. This subpopulation was also found in the A431 SCC cell line, suggesting that EGFR may be a marker distinguishing stem cells (SC) and their transient amplifying (TA), destined-to-differentiate progeny.

2. EGFR can be asymmetrically distributed in dividing normal and cancer keratinocytes



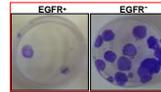
Determinants of cell fate are distributed asymmetrically in dividing stem cells. The staining of PAF-fixed normal human keratinocytes (NHK) with FITC conjugated anti-EGFR antibody and the addition of 10ng/ml EGF-AlexaFluor488 to A431 squamous cell carcinoma (SCC) culture (time lapse) revealed an asymmetric distribution of EGFR in dividing cells, suggesting that EGFR may be a cell fate determinant

3. EGFR⁻ A431 cells can self-renew and produce EGFR⁺ progeny



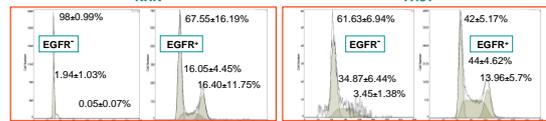
Asymmetric division is a unique property of stem cells. A431 cells were immunoreacted with anti-EGFR-FITC antibody for 30min at room temperature and sorted into EGFR⁻ and EGFR⁺ fractions using Miltenyi and FACS sorting procedures. Both fractions were cultured for 7 days and resorted a minimum of 4 times (as above). Successive sorting and culturing of A431 EGFR⁻ cells demonstrated that similarly to stem cells, they are able to divide asymmetrically to maintain their own number and to generate fast proliferating EGFR⁺ progeny, which under normal circumstances after a few generations of cell division cease their proliferation to enter their differentiation program.

4. EGFR⁻ cells have higher clonogenic potential than their EGFR⁺ progeny



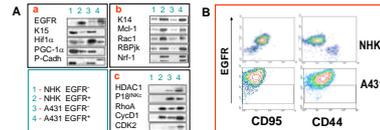
Stem cells have high clonogenic potential. A431 cells were sorted by FACS according to the expression of EGFR on their cell surface. After 21 days of culturing EGFR⁻ cells formed significantly more colonies than their EGFR⁺ progeny.

5. Cells in the EGFR⁻ subpopulation appeared more quiescent than in their EGFR⁺ counterpart and differed significantly in cell cycle profile



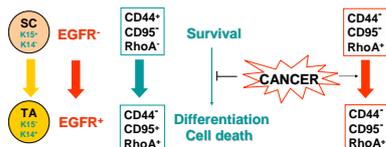
Quiescence is a hallmark of stem cells. NHK and A431 cells were labeled with anti-EGFR antibody to distinguish EGFR⁻ from EGFR⁺ cells and with PI to measure DNA content in respective subpopulations. Flow cytometry analysis revealed more quiescent cells in the EGFR⁻ subpopulation than in EGFR⁺, confirming mitogenic activity of EGFR. Interestingly, while most of the EGFR⁻ NHK cells remained in the G0/G1 phase of the cell cycle, A431 cancer cells entered S-phase despite the absence of extracellular EGF, demonstrating their "active" state and suggesting that activation of cancer stem cells may not be dependent on EGFR-signaling.

6. A set of different gene products distinguishes normal and cancer EGFR⁻ and EGFR⁺ keratinocytes



Microarray (not shown), western blot (A) and flow cytometry (B) analysis revealed important differences in the molecular profile of EGFR⁻ and EGFR⁺ cancer and normal keratinocytes. Note that switch to the EGFR⁺ phenotype affects genes involved in cell division and differentiation, mitochondria function, adherence, cell fate, and cell survival. Examples of some of those genes: a) down-regulated b) up-regulated and c) differentially expressed in normal and cancer keratinocytes.

CONCLUSIONS:



- EGFR⁻ keratinocytes emerge as cells with stem cell-like properties. In the A431 cell line these cells appear functionally more active than their normal counterparts.
- Acquisition of EGFR on the cell surface appears to be associated with simultaneous expression of cell death inducing and cell death inhibiting factors and a shift of a cell from the stem cell to the transient amplifying compartment. This step may be dysfunctional in SCC where the EGFR⁺ progeny seem to be endowed with some traits normally reserved for stem cells.
- Therapeutics targeting EGFR on tumors may spare EGFR⁻ stem cell-like cells. However, differences in the phenotypic profile of cancer and normal EGFR⁻ cells hold potential for development of novel anticancer drugs that would selectively target cancer and not normal stem cells.

PARTIE IV :

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le renouvellement constant de l'épiderme de la peau humaine et de ses appendices se fait grâce à l'homéostasie tissulaire, c'est-à-dire l'équilibre entre le nombre de cellules éliminées par desquamation et le nombre de cellules nouvellement formées au sein de la couche basale. Ce processus est étroitement contrôlé par les cellules souches, quiescentes, au sein d'un microenvironnement appelé niche. Pour le renouvellement normal comme suite à une blessure, les cellules souches se divisent asymétriquement pour produire une cellule souche fille, qui permet le maintien du pool de cellules souches dans la niche, et une cellule d'amplification transitoire qui entre en phase courte de prolifération avant de migrer dans les couches suprabasales, subir des changements morpho-physiologiques correspondant à la voie de différenciation et mourir. La dernière couche de l'épiderme, la couche cornée, est constituée de cellules mortes qui forment une couche imperméable à la sortie inappropriée de fluides et aux agressions extérieures. Etant donné l'importance de l'homéostasie tissulaire pour une protection de tout notre corps, il est primordial de connaître ce processus afin de détecter d'éventuels défauts pouvant être à l'origine de pathologies aussi sérieuses que les cancers cutanés.

Les cellules souches sont étudiées depuis longtemps (Richards BM, *Nature*, 1955), mais voient leur intérêt grandir depuis une dizaine d'années. Au sein de l'épiderme, plusieurs équipes ont pu identifier des marqueurs qui caractérisent les cellules souches. Moraso *et al.* en ont fait un résumé complet (Morasso MI et Tomic-Canic M, *Biol.Cell*, 2005). On trouve d'abord la capacité à retenir un marquage, ce qui donne les « Label Retaining Cell » (LRC) (Mackenzie IC et Bickenbach JR, *Cell Tissue Res.*, 1985). Différentes molécules d'adhérence ont aussi été considérées comme marqueurs de cellules souches épidermiques (l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et l'intégrine $\beta 1$) comme des protéines impliquées dans la transition épithélium-mésenchyme comme $\Delta Np63$. Plusieurs éléments indiquent que les marqueurs des cellules souches diffèrent entre la peau murine et humaine et qu'il n'y a pas de marqueur unique qui permettrait d'obtenir une population pure de cellules souches (Ambler CA et Maatta A, *J.Pathol.*, 2008).

Pour notre part, nous avons identifié les cellules EGFR négatives comme des cellules aux propriétés de cellules souches : auto-renouvellement, potentiel de différenciation, clonogénicité, exclusion de la Rhodamine 123, un marqueur des cellules de la « side population » et quiescence (Radley JM *et al.*, *Exp.Hematol.*, 1999). Nos

données soutiennent l'idée que les cellules EGFR⁻ forment le réservoir de cellules reproductrices, capables de reconstituer l'hétérogénéité cellulaire en culture et suggère que l'EGFR est un déterminant du destin des kératinocytes. Nos résultats sont en accord avec la littérature puisque l'antagoniste de l'EGFR, LRIG1 (Leucin Rich repeats and Immunoglobuline like domains containing proteins) est lui aussi considéré comme marqueur de cellules souches (Jensen KB et Watt FW, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2006). LRIG1 diminue la prolifération des cellules sans changer le ratio entre le nombre de cellules souches et de cellules d'amplification transitoire. Il stimule l'ubiquitination de l'EGFR qui conduit à sa dégradation, bloque l'exposition de l'EGFR à la surface des cellules ce que nous avons associé à des cellules EGFR négatives qui sont des cellules souches de l'épiderme. Néanmoins, il a été montré que LRIG1 est sous exprimé dans le carcinome épidermoïde (Tanemura A et al., Dermatol.Surg., 2005) confirmant nos résultats qui montrent que l'acquisition de l'EGFR à la surface cellulaire stimule le cycle cellulaire et l'expression des protéines qui le régulent.

De façon intéressante, un élément clé, c-myc régule le moment et la fréquence de division des cellules souches. Les fonctions de la niche ou bulge dans l'épiderme, sont partiellement régulées par c-Myc. C'est un élément très important dans la régulation de la niche, puisque l'augmentation ou la diminution de son expression induit une déplétion en cellules souches épidermiques en modulant les interactions adhésives avec le microenvironnement local (Waikel RL et al., Nat.Genet., 2001 ; Braun KM et al., Development, 2003 ; Frye M et al., Development, 2003 ; Zanet J et al., J.Cell Sci., 2005). Le maintien de l'expression de c-Myc pousse les cellules souches à entrer dans le compartiment d'amplification transitoire et initier le processus de différenciation terminale (Watt FM et al., Nat.Rev.Cancer, 2008). Par ailleurs, c-Myc est une cible connue de l'EGFR, témoigné par l'activation de la voie ERK1/2 et l'induction de l'expression de la cycline D1. Cependant, le lien entre l'expression de c-Myc et les cellules EGFR négatives, qu'on considère comme cellules souches, reste encore à établir. Nous avons seulement la preuve directe que c-Myc peut être sous-régulé dans ces cellules. Les cellules EGFR⁻ expriment un haut niveau de Hif-1 α , un répresseur fort de c-Myc (Garcia JA, Sci STKE, 2006), suggérant que dans les cellules souches kératinocytaires, la quiescence peut être contrôlée par Hif-1 α . On ne sait cependant pas pourquoi les cellules souches EGFR⁻ surexpriment Hif-1 α .

La niche est un environnement réduit en oxygène. Cette réduction des ROS permet la protection des cellules souches hématopoïétiques à long terme contre le stress oxydatif (Jang YY et Sharkis SJ, *Blood*, 2007) et stimule la quiescence et l'expression de marqueurs de cellules souches. Cette diminution des ROS est associée à une augmentation des enzymes antioxydantes qui sont stimulées par le co-activateur PGC1 α (Finkel T, *Nature*, 2006). Dans notre étude, les cellules EGFR négatives expriment plus fortement PGC1 α que les cellules EGFR positives, ce qui les protège contre des stress oxydatifs comme pour les cellules souches hématopoïétiques. PGC1 α stimule aussi la biogénèse des mitochondries qui a lieu en réponse à une demande en ATP. La surexpression de PGC1 α conduit à une augmentation de l'expression de gènes régulant la réponse à l'hypoxie par la stabilisation de la protéine Hif1 α (O'Hagan KA *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2009), qui est elle aussi plus exprimée dans les cellules EGFR négatives par rapport aux cellules EGFR positives. L'activation d'Hif1 α par la diminution d'oxygène induit des gènes impliqués dans la glycolyse (Ramirez-Bergeron DL et Simon MC, *Stem Cells*, 2001). Ce processus s'applique pour les cellules souches et leur quiescence mais l'hypoxie a aussi lieu au cours du développement tumoral. Il en ressort que les cellules souches peuvent donc être à l'origine des cancers et que Hif1 α joue un rôle primordial dans le contrôle du développement tissulaire normal.

Dans notre étude, on a pu observer la division asymétrique des cellules EGFR négatives qui, lors de cette division, forment une cellule EGFR négative et une cellule EGFR positive. On a donc démontré que l'EGFR peut être un déterminant du destin des cellules, comme c'est le cas pour la voie Notch avec la répartition asymétrique du facteur Numb dans les deux cellules filles issues de la division des cellules souches de l'épiderme (Blanpain C et Fuchs E, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 2009).

Les signaux qui agissent sur la niche poussent les cellules souches quiescentes à entrer dans le cycle pour se diviser et produire des cellules d'amplification transitoire dont le destin est de se différencier et mourir. Pour l'épiderme il a déjà été montré que les voies WNT et BMP gouvernent les interactions épithélium-mésenchyme dans la niche (Blanpain C et Fuchs E, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 2009).

La transition de la quiescence à l'activation des cellules souches a été largement étudiée pour les cellules souches hématopoïétiques avec une importance particulière apportée aux gènes du cycle cellulaire (Yamashita YM, *Frontiers in Biosci.*, 2009). Zhao

et al. ont listé une série de gènes qui sont impliqués dans cette transition. L'ajout d'un milieu spécifique conduit à une augmentation d'expression des gènes impliqués dans la liaison à l'ADN, la transcription et les processus post-transcriptionnel, dans la traduction ainsi que dans les voies de signalisation et de régulation du cycle cellulaire comme p53 ou la cycline G1, dans le métabolisme comme des protéines impliquées dans la respiration et la glycolyse, des gènes du cytosquelette et de la MEC comme MAP4 ou l'actine β , des cytokines ([Zhao Y et al., Biochem.Biophys.Res.Comm., 2004](#)). Notre modèle n'est pas aussi bien établi, mais nos premiers résultats partent dans la bonne direction, ce qui nous donne de bonnes bases sur lesquelles poursuivre nos recherches.

De plus, comme cela a été montré pour les cellules souches hématopoïétiques, nous avons pu mettre en évidence la présence de deux types de cellules souches dans l'épiderme : les cellules souches quiescentes, identifiées comme les cellules EGFR négatives Rhodamine 123 négatives et les cellules souches actives, EGFR positives Rhodamine 123 négatives. La deuxième sous population, plus importante dans la lignée de carcinome épidermoïde, pourrait contribuer à l'hyperprolifération des cellules cancéreuses, mais nos prochains résultats devront éclairer les points obscurs sur ce sujet.

En plus de cette différence au niveau du pourcentage de cellules Rhodamine 123 négative EGFR positive entre les cellules souches normales et les cellules souches cancéreuses, on a pu voir que la transition de cellules souches à cellules d'amplification transitoire, dans la lignée de carcinome épidermoïde, impliquait des facteurs du cycle cellulaire de façon plus importante et que le phénotype des cellules EGFR négatives et positives était différent dans les KHN et les A431. La dépendance de CD44 vis-à-vis de l'EGFR dans les A431 comparé aux KHN peut tenir du fait que le ligand de CD44, l'acide hyaluronique est sécrété par différentes cellules tumorales et peut même s'accumuler dans certaines tumeurs épithéliales comme dans les cellules du cancer du colon ou du sein ([Kim Y et al., J.Biol.Cell, 2008](#)). Ceci a pour conséquence une interaction plus abondante entre CD44 et l'EGFR qui conduit à la stimulation de la motilité cellulaire via la voie PKC/Akt/Rac1/ROS. Ainsi dans les cancers les cellules hyper prolifèrent du à la surexpression de l'EGFR mais deviennent plus mobiles et donc plus néfastes.

La transition de cellules souches à cellules d'amplification transitoire est donc extrêmement importante pour assurer le bon renouvellement tissulaire sans induire d'hypo ou d'hyper prolifération. Le programme d'expression des protéines influençant la transition doit être bien déterminé afin de visualiser des défauts de programmation qui aboutissent finalement au développement du cancer. Etant donné le large panel de fonctions de l'EGFR, il est important de dessiner ses différentes actions au cours du temps lors de la division des cellules souches, la transition en cellules d'amplification transitoire ainsi que la prolifération et la différenciation pour pouvoir par la suite cibler ses partenaires fonctionnels et agir sur la partie de la voie défectueuse.

Une fois que les cellules expriment l'EGFR à leur surface, elles entrent dans un processus irréversible de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire. Elles subissent une succession de changements morpho-physiologiques dont chaque étape correspond à un stade de différenciation qui est également associé à un mouvement dans les couches suprabasales de l'épiderme vers la surface, où les cellules mortes forment une barrière imperméable à la sortie néfaste de fluides vitaux et l'entrée d'agressions extérieures.

Basé sur nos résultats et ceux d'autres équipes, nous proposons une interprétation de nos données dans le modèle suivant (Figure 18). Dans l'épiderme, les cellules souches EGFR⁻Rh⁻ non cyclantes, CD95⁻ adhèrent à la niche (CD44⁺) où elles sont protégées de l'apoptose induite par le récepteur et de la mort cellulaire induite par les ROS en sur-exprimant entre autres, Hif1 α et l'antioxydant PGC1 α . Ce statut est perturbé quand les cellules souches reçoivent un signal pour se diviser, comme par Wnt ou Shh. Les cellules souches deviennent actives. Les événements moléculaires qui accompagnent l'activation des kératinocytes sont la sur-régulation de CDK4 et une diminution de Lrig1 (Jensen KB *et al.*, *Cell Stem Cells*, 2009). Il en résulte que les cellules qui se divisent sur-régulent EGFR mais restent Rh123⁻. Ce statut est transitoire et les cellules redeviennent quiescentes après leur division asymétrique. C'est peut être cette étape qui diffère entre les cellules souches normales et les cellules souches cancéreuses qui restent constamment actives. Les cellules EGFR⁺ quittent alors la niche et débutent leur déplacement dans le programme de différenciation qui est anormal dans les cellules cancéreuses.

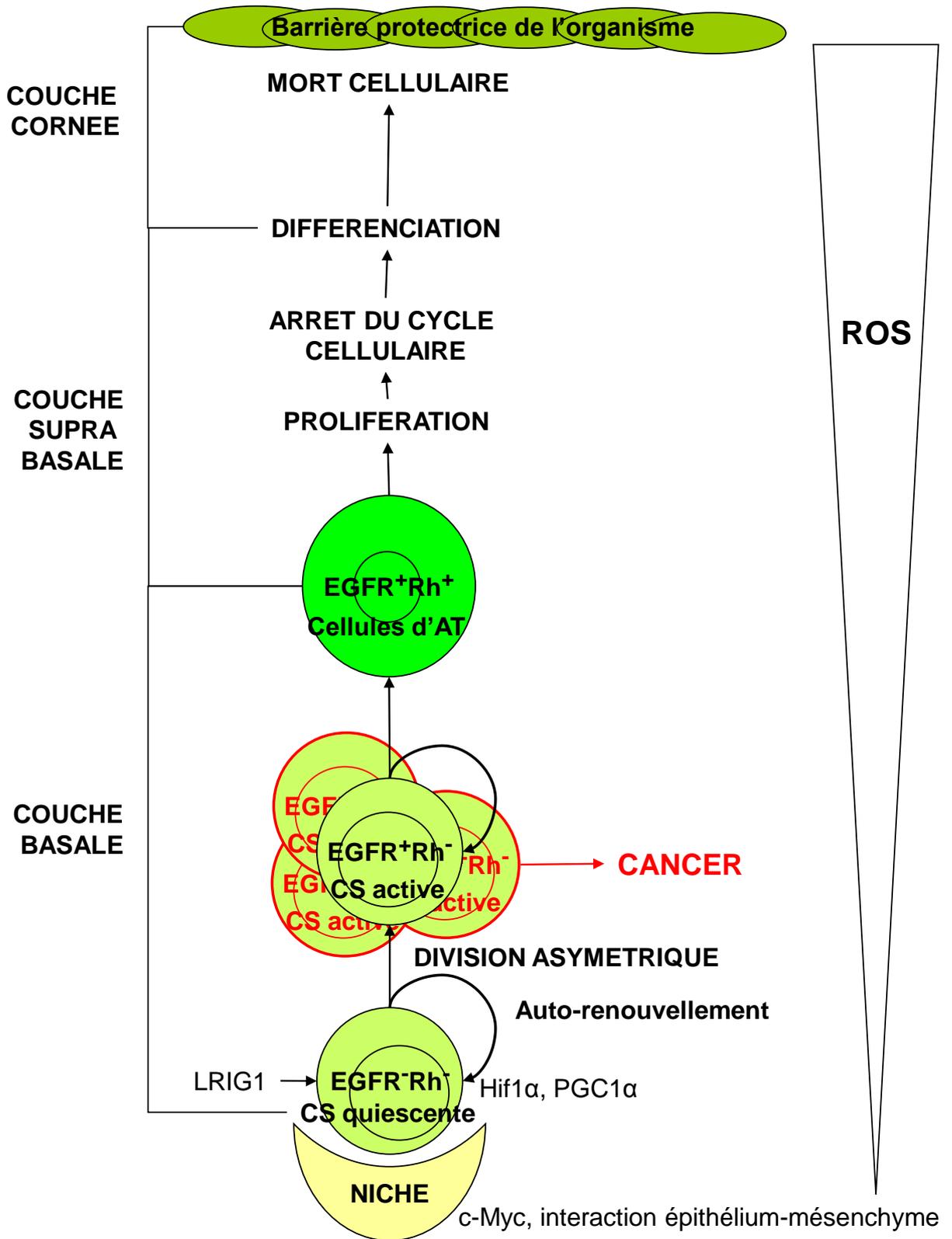


Figure 18 : Schéma de conclusion.

Conclusion

Notre étude et bien d'autres ont montré l'importance de connaître les effecteurs et voies de signalisation qui participent à l'homéostasie tissulaire. Pour l'épiderme, plusieurs voies ont été validées comme WNT ou Notch.

Basée sur nos études, nous avons pu montrer que la voie de l'EGFR est également essentielle pour le bon renouvellement de l'épiderme.

Même si des points sont encore à confirmer, nos travaux sont intéressants pour la compréhension du bon fonctionnement de l'épiderme et cibler les défauts pouvant conduire au développement de cancers cutanés et amenant à envisager des cibles thérapeutiques pour parer à ces problèmes et succéder à l'inefficacité des traitements actuels qui ciblent les cellules exprimant l'EGFR à leur surface cellulaire.

PARTIE V :

AUTRES TRAVAUX

Human dental Pulp Stem Cells Differentiate into Neural Crest-Derived Melanocytes and Have Label-Retaining and Sphere-Forming Abilities

(publié dans Stem Cells and Development)

A. Stevens, T. Zuliani, C. Olejnik, **H. Le Roy**, H. Obriot, J. Kerr-Conte, P. Formstecher, Y. Bailliez and R. Polakowska

Nous avons eu la chance de pouvoir élargir nos connaissances sur les cellules souches par une collaboration avec Yves Bailliez, dentiste et l'accueil de plusieurs étudiants qui ont réalisé un Master Recherche au sein du laboratoire. Nous avons étudié l'existence de cellules présentant des propriétés de cellules souches au sein de la pulpe dentaire.

La dent, issue des crêtes neurales d'origine ectomésenchymateuse, est un tissu qui comme la peau subit une série d'évènements qui aboutit à la différenciation dans ce cas appelée minéralisation. Parmi les types cellulaires non renouvelables de la dent se trouve la dentine qui est uniquement remplacée après une blessure via la différenciation des odontoblastes. En 2000 Gronthos et al ont montré la présence d'une population de cellules souches mésenchymateuses de la pulpe dentaire (DPSC) mais depuis aucun marqueur n'a pu être trouvé pour identifier ces cellules souches. Nous avons donc cherché à mieux caractériser ces cellules.

Dans les 7 extractions de pulpe dentaire de prémolaires ou de dents de sagesse, seulement $0,053 \pm 0,02\%$ des cellules pouvaient former des colonies en culture. Ces colonies ressemblaient à celles formées par les cellules souches mésenchymateuses et on a vu que toutes les cellules de ces colonies pouvaient reformer des colonies après repiquage et présentaient des propriétés de prolifération et de clonogénicité accrues. Les cellules issues de la pulpe dentaire, qui ont poussé en culture, présentaient des similitudes avec les cellules souches mésenchymateuses au niveau de leur phénotype : CD34⁻, CD45⁻, CD44⁺, STRO-1⁺. CD133 et CD271 (LNGFR) étaient faiblement exprimés aux passages précoces mais leur expression augmentait au cours des passages successifs en culture suggérant l'influence de l'environnement à stimuler

l'expansion des cellules souches ou une différenciation spontanée de ces cellules en culture.

Pour déterminer les propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation, les cellules ont été placées dans différents milieux de culture. Les cellules de la pulpe dentaire pouvaient se différencier en odontoblastes matures (DSP⁺, MEPE-1⁻, DMP-1⁺, Aggrecan⁻), en chondroblastes (formation de structure en 3 dimensions DSP⁻, Aggrecan⁺, DMP-1⁺), en ostéoblastes (apparence cubique puis formation de nodules minéralisés Van Kossa⁺ et rouge d'Alizarine⁺), en adipocytes (morphologie allongée et Oil Red⁺) ou en mélanocytes (Mart-1⁺). Donc, les cellules souches de la pulpe dentaire comme les cellules souches mésenchymateuses, ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires d'origine mésenchymateuse.

Parmi les cellules de la pulpe dentaire, on a montré que les cellules CD34⁻ étaient plus clonogéniques que les cellules CD34⁺, exprimaient plus fortement CD44 et CD133 et donc pouvant être considérées comme les véritables cellules souches de la pulpe dentaire. Seules les cellules CD34⁻ pouvaient se différencier en ostéoblastes, en odontoblastes, en adipocytes ou en mélanocytes. Les sphères formées par les cellules CD34⁻ étaient nestine⁺, LNGFR⁺, c-kit⁺, marqueurs de cellules souches des crêtes neurales.

Il est connu que les cellules souches cyclent peu fréquemment et donc peuvent retenir des sondes fluorescentes plus longtemps que les cellules qui cyclent plus souvent. Les cellules de la pulpe dentaire ont donc été marquées avec du Dil puis laissées en culture pendant 4 jours (temps pour que les cellules se divisant rapidement perdent le marquage). Les cellules ont été triées pour collecter les cellules Dil^{faible} (7,2%) et Dil^{fort} (0,7%) et ont été ensuite remises en culture. 40% des cellules Dil^{faible} et 26% des cellules Dil^{fort} ont formé des colonies mais les cellules Dil^{fort} ont aussi formé spontanément des sphères. Par ailleurs, quand une cellule Dil^{fort} ou Dil^{faible} était mise en culture chacune des cellules Dil^{fort} pouvait former une sphère avec en son centre une cellule Dil^{fort} entourée de cellules Dil^{faible} ou Dil⁻. Donc la formation de sphères est une propriété de cellules retenant le Dil correspondant aux cellules se divisant lentement.

Tous ces éléments sont intéressants du fait qu'ils apportent des perspectives de réparation et de reconstruction de la dent. De plus, l'étude de ce tissu issu des crêtes

neurales approuvent nos résultats sur les cellules de mélanome. La formation de sphères comme caractéristiques de cellules souches de différentes origines tissulaires nous encourage à poursuivre nos études de recoupement des différentes caractéristiques des cellules souches pour les différents tissus qui nous intéressent.

Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate into Neural Crest-Derived Melanocytes and Have Label-Retaining and Sphere-Forming Abilities

Angelique Stevens,^{1,2} Thomas Zuliani,² Cecile Olejnik,^{1,2} Helene LeRoy,² Helene Obriot,² Julie Kerr-Conte,² Pierre Formstecher,^{2,3} Yves Bailliez,¹ and Renata R. Polakowska²

Adult tissues contain highly proliferative, clonogenic cells that meet criteria of multipotent stem cells and are potential sources for autologous reparative and reconstructive medicine. We demonstrated that human dental pulp contains self renewing human dental pulp stem cells (hDPSCs) capable of differentiating into mesenchymal-derived odontoblasts, osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes and striated muscle, and interestingly, also into non-mesenchymal melanocytes. Furthermore, we showed that hDPSC cultures include cells with the label-retaining and sphere-forming abilities, traits attributed to multipotent stem cells, and provide evidence that these may be multipotent neural crest stem cells.

Introduction

TOOTH FORMATION RESULTS FROM sequential and reciprocal interactions between ectodermal and ectomesenchymal cells of the oral mucosa. Ectomesenchymally derived teeth cells originate from cephalic neural crests which migrate to the first brachial arch area and give rise to cephalic and facial conjunctive tissues, including adipose, bone and cartilage as well as dentin [1]. The neural crest-derived cells making up these tissues are of mesenchymal lineage that differs from the mesoderm-derived mesenchymal cell lineage of a bone marrow mesenchymal stem cell (BMMSC) [2,3].

Human teeth are made of soft pulp that is a non-mineralized, vascularized, conjunctive tissue with nutritional, sensorial, immune and dentinogenic functions, and of three different mineralized tissues: dentin, cementum and enamel. Dentin and cementum formed, from ectomesenchymally derived odontoblasts and cementoblasts, respectively. Enamel is secreted by ameloblasts of epithelial origin. The mineral phase of these three tissues is hydroxyapatite marking terminal differentiation of the respective cells [1,4].

Mature human teeth are not remodelled during adult life. An exception is reparative dentin formed during the process of odontoblast differentiation in response to injury

[5]. Odontoblast differentiation which proceeds in several successive steps, involves withdrawal from the cell cycle, cellular polarization, formation of a cellular process and finally synthesis and secretion of specialized proteins [1,4]. Odontoblasts first secrete predentin mainly composed of type I collagen and non-collagenic proteins, including members of SIBLINGS (*Small Integrin-Binding Ligand N-Linked Glycoproteins*) family: MEPE (*matrix extracellular phosphoglycoprotein*), DMP-1 (*dentin matrix protein-1*) and DSPP (*dentin sialophosphoprotein*) cleaved into DSP (*dentin sialoprotein*) and DPP (*dentin phosphophoryn*). Predentin matures into dentin during a not fully understood mineralization process preceded by cleavage of DSPP into DSP and DPP [6,7]. The sequence of molecular events during odontoblast differentiation and dentin formation involves downregulation of MEPE [8] and expression of DMP-1, which appears to control the DSPP levels [9,10].

Discovery that human mature pulp tissue contains a population of multipotent mesenchymal dental pulp stem cells (DPSC) with high proliferative potential for self-renewal and the ability to differentiate into functional odontoblasts [11], has revolutionized dental research and opened new avenues in particular for reparative and reconstructive dentistry and tissue engineering in general. Since the initial description of DPSC, several laboratories have reported the

¹Faculté Dentaire, Université Lille 2, Lille, France.

²Université Lille 2, Faculté de Médecine, Lille, France.

³CHRU, Lille, Centre de Biologie Pathologie, Lille, France.

PARTIE VI :

MATERIEL ET
METHODES

1. CULTURE CELLULAIRE

1.1. Culture des cellules

Les échantillons de peau, issus du service de chirurgie plastique de l'hôpital Salengro de Lille, sont obtenus par accord avec les directives du comité éthique de l'Université de Lille 2. Les prélèvements sont rincés au PBS puis sectionnés en petits morceaux d'environ 5 mm de large et disposés dans une boîte de Pétri épiderme vers le fond puis recouvert d'une solution de Dispase 1U/ml (Gibco™, Invitrogen) incubée à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, l'épiderme et le derme sont séparés mécaniquement. L'épiderme est ensuite digéré à la trypsine-EDTA (Invitrogen) pendant 30 minutes, filtré sur un tamis de 100µm. Après centrifugation, les kératinocytes (KHN : Kératinocytes Humains Normaux) sont comptés etensemencés dans des boîtes de culture dans un milieu de croissance dépourvu en sérum et pauvre en calcium, du SFM (Serum Free Medium, Life Technologies, Inc.) à 37°C et 5% de CO₂.

Les cellules de carcinome baso-cellulaire (CBC) sont cultivées dans le même milieu.

Les cellules de carcinome épidermoïde A431 sont cultivées dans un milieu riche en sérum, du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco™) supplémenté avec 10% de SVF (Sérum de Vœu Foetal) et 1% de Penicilline/Streptomycine et maintenues dans un incubateur humide à 37°C contenant 5% de CO₂.

Les cellules nommées précédemment sont cultivées en conditions adhérentes dans des plaques ou des boîtes de culture coatées pour la culture.

Le temps de doublement des cellules est calculé selon la formule suivante :
Temps de doublement = (log2 x temps en culture) / (log nombre de cellules au final – log nombre de cellules au départ)

1.2. Culture en condition de formation de sphères

Pour générer des sphères primaires, 2x10⁴ cellules sontensemencées dans des plaques à adhérence faible (Corning Costar Co, ATGC, France) et cultivées dans du milieu DMEM/F12 supplémenté avec 20ng/ml d'EGF (Stem Cells Biotechnologies,

Vancouver BC), 1x de supplément B27 (Gibco® Invitrogen, Cergy Pontoise France) et 20ng/ml de rHu bFGF (PromoKine-PromoCell GmbH, Germany) et incubées dans un incubateur humide avec 5% de CO₂ et à 37°C.

Pour passer de sphère primaire à secondaire, les sphères sont récupérées et laissées décanter dans un tube 15ml puis le milieu est aspiré délicatement et les cellules sont rincées avec du PBS qu'on laisse à nouveau décanter avant d'aspirer le milieu et de mettre 1ml de trypsine 5 minutes à 37°C. Après neutralisation et centrifugation, les cellules dissociées sont comptées avant d'être remises en culture dans les plaques d'adhérence faible.

Le potentiel de formation de sphère est calculable selon la formule

$$\text{SFU} = (\text{nombre de sphères comptées}) / (\text{nombre de cellules ensemencées}) \times 100$$

1.3. Protocole de transfection (selon le protocole de Lipofectamine 2000)

L'ensemencement de 40 000 cellules par puits de chamber slide ou 200 000 cellules par puits de plaque de 12 puits précède de 24 heures la transfection qui est réalisée selon le protocole de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) avec 0,3µg d'ADN (1µg pour un puits de plaque 12 puits) et 5µl de lipofectamine 2000 (15µl pour un puits de plaque 12 puits). Dans un premier temps, l'agitation au doigt du tube contenant l'ADN permet le mélange avec du milieu sans sérum. Ce mélange est laissé reposer pendant 5 minutes, temps pendant lequel la lipofectamine 2000 est mise dans du milieu sans sérum et mélangé par agitation du tube avec le doigt. La lipofectamine 2000 et l'ADN sont mis en contact, mélangés par agitation du tube avec le doigt et laissés reposer pendant 30 minutes à température ambiante, temps pendant lequel les puits sont rincés avec du PBS et du DMEM sans sérum est ajouté au puits avant d'y ajouter le complexe lipofectamine 2000/ADN lentement goutte à goutte. Après 4 à 5 heures en culture, le milieu est remplacé par du milieu avec du sérum.

Pour réaliser des transfections stables, 24 heures après transfection 1/125^e de généticine (G-418 Sulfate) (Gibco™) peut être ajouté pour sélectionner les cellules transfectées et créer des transfections stables qu'on obtient après 3 semaines de sélection.

1.4. Différents traitements appliqués aux cellules

Pour pouvoir suivre la prolifération et distinguer différentes populations de cellules, nous avons fait un marquage avec le Dil ou DiO (Vybrant Cell-Labeling Solutions, Invitrogen). On prend 1 million de cellules qu'on rince deux fois avec du milieu sans sérum puis on les resuspend dans 1 ml de milieu sans sérum auquel on ajoute 5µl de Dil ou DiO qu'on laisse incubé 25 minutes à température ambiante. Puis on rince les cellules 2 fois avec du milieu complet et on met les cellules en culture et/ou on les passe en cytométrie. Le DiO et le Dil sont analysables sur les canaux 525nm et 585nm respectivement.

2. IMMUNOMARQUAGE

2.1. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons se fait de différentes façons selon le matériel initial.

Lames congelées

Les lames sont sorties et séchées 10 minutes à l'air puis rincées deux fois 10 minutes avec du PBS (Phosphate Buffer Saline) et fixées/perméabilisées avec du méthanol froid pendant 10 minutes. Les rinçages au PBS précèdent la saturation.

Lames paraffines

La première étape est le déparaffinage des lames en les faisant chauffer sur une plaque chauffante puis en les trempant dans 3 bains de xylène pendant 10 minutes. Les lames sont ensuite réhydratées dans des bains d'alcool 100%, 90% et 70% puis rincées dans un bain d'eau distillée. Puis les lames sont baignées dans un tampon citrate 10X chauffé à 95°C pendant 10 minutes et refroidies à température ambiante avant d'être saturées.

Cellules adhérentes

Un marquage directement sur des lames fixées à des compartiments de culture (chamber slides) débute par l'aspiration du milieu de culture puis le rinçage des cellules

deux fois au PBS. Les cellules sont ensuite fixées avec du ParaFormaldéhyde 4% pendant 10 minutes puis rincées deux fois au PBS et perméabilisées avec une solution de Triton 0,1% pendant 10 minutes à température ambiante puis rincées à nouveau deux fois avec du PBS.

Cellules en suspension

Les cellules peuvent être décollées, comptées et resuspendues à une concentration de 1 million de cellules par ml avant d'être disposées dans des cônes de Cytospin et centrifugées à 350 tpm pendant 5 minutes. Après avoir retiré le cône on obtient un spot de cellules qui l'on peut ensuite fixer au PAF et perméabiliser avec du triton 0,1% puis réaliser un marquage immunohistochimique.

2.2. Protocole de marquage et de détection

La saturation est réalisée grâce à une solution de PBS 1%BSA additionné d'1% de sérum d'âne ou de chèvre pendant 1 heure et suivie de l'incubation avec l'anticorps primaire pour la nuit à 4°C. Après trois rinçages au PBS pendant 10 minutes, l'anticorps secondaire est mis pendant 1 heure et rincé 3 fois au PBS. Le marquage des noyaux peut se faire par l'ajout de Yo-Pro dilué au 1/1000^e et incubé pendant 15 minutes à température ambiante ou directement par le DAPI contenu dans le milieu de montage vectashield qui forme une solution de liaison entre la lame et la lamelle. Les marquages sont observés sous un microscope à fluorescence MDR de Leica® et des photographies sont prises avec à l'aide d'une caméra et du logiciel QFluoro (Leica®).

3. WESTERN-BLOT

Cette technique est divisée en différentes phases : la préparation des échantillons, leur dépôt sur gel d'acrylamide, l'électrophorèse, le transfert sur membrane de nitrocellulose, la saturation, l'anticorps primaire, l'anticorps secondaire puis la révélation. Nous avons utilisé les gels pré-coulés NuPAGE Novex Bis-Tris Gels (Invitrogen).

Pour préparer les échantillons, les cellules sont récoltées puis rincées au PBS avant d'ajouter 100µl de tampon RIPA (10mM Tri-HCl, pH 7,4 ; 150mM NaCl ; 10mM

MgCl₂ ; 1mM de PMSF ; 1% de Nonidet P-40 ; 1/1000^e d'inhibiteurs de protéases (Sigma) ajouté extemporanément) au culot et de lyser les cellules sur glace pendant 1 heure en vortexant toutes les 10 minutes. Une centrifugation à 15 000g pendant 20 minutes permet de séparer les protéines dans le surnageant des fragments non lysés dans le culot.

Le dosage des protéines est fait selon la méthode de Bradford : on prépare une gamme étalon d'albumine dont on prélève 50µl de chaque concentration qu'on dispose dans un puits de plaque 96 puits auquel on ajoute 950µl de bleu de Coomassie. On prélève 1µl de l'échantillon à doser auquel on ajoute 49µl de PBS et 950µl de bleu de Coomassie. On lit ensuite la DO à 595nm au spectrophotomètre. Après avoir établi la droite de régression linéaire on peut déterminer la concentration des échantillons.

Après le dosage, la quantité de protéines est prélevée et on ajoute 2,5µl de NuPAGE LDS Sample Buffer 4X, 1µl de NuPAGE Reducing Agent 10X avant de dénaturer les échantillons 10 minutes à 70°C.

On prépare le tampon d'électrophorèse MES (grosses protéines) ou MOPS (petites protéines) selon la taille des protéines recherchées en diluant 20 fois le tampon dans de l'eau déionisée supplémenté avec 500µL de NuPAGE Antioxydant. Après dépôt, la migration est réalisée à 200V constant pendant 35 minutes pour le tampon MES et 50 minutes pour le tampon MOPS.

Pour le transfert, un sandwich contenant le gel d'acrylamide, la membrane de nitrocellulose ainsi que des papiers filtres et des éponges est réalisé et placé dans une solution de NuPAGE Transfer Buffer (50ml de 20X NuPAGE Transfer Buffer + 100ml de méthanol + 850ml d'eau déionisée + 1ml de NuPAGE Antioxydant). Le transfert se fait à 30V constant pendant 1 heure s'il y a un gel ou 2 heures s'il y a deux gels.

La saturation des membranes est faite avec du TBS (Tris-HCl, pH 7,5 ; 140mM NaCl et 0,05% de Tween 20%) et 5% de lait.

La révélation se fait avec le kit ECL+ (Amersham).

Des révélations successives sur la même membrane nécessitent une étape de déshybridation à 50°C pendant 30 minutes avec une solution de déshybridation, suivi d'un rinçage à l'eau puis au TBS avant que la membrane ne soit saturée à nouveau avec du TBS 0,05% de Tween 5% de lait pendant une heure et qu'un nouvel anticorps ne soit à nouveau mis à incuber avec la membrane.

4. CYTOMETRIE DE FLUX

4.1. Phénotypage

Pour réaliser un phénotypage de cellules, il suffit de détacher les cellules avec une solution de trypsine, avant de les compter et de les répartir dans des tubes de cytométrie à une concentration de $4 \cdot 10^6$ cellules/ml. L'incubation des cellules avec l'anticorps se fait généralement à 37°C (sauf pour l'EGFR-PE qui se fait sur glace) à une dilution 1/50^e et pendant 30 minutes avant que 500µl de PBS soit ajouté et que les échantillons soient analysés sur un cytomètre EPICS-XL (Beckman-Coulter)

La révélation de l'exclusion se fait de façon légèrement différente. Après le détachement des cellules, un million de cellules est dilué dans 1ml de milieu complet et 0,1µl de Rhodamine 123 (1mg/ml) est ajouté pour 30 minutes à 37°C. Après deux rinçages avec du milieu complet, le culot est suspendu dans 500µl de milieu complet et mis à 37°C pendant 1 heure supplémentaire pour que les cellules excluent la rhodamine. Les cellules sont ensuite mises sur glace pour l'analyse en cytométrie de flux ou centrifugées pour un marquage éventuel.

4.2. Tri cellulaire

Pour étudier en parallèle les cellules EGFR^{-/+} et Rhodamine^{-/+}, nous les avons séparées après un marquage similaire à celui utilisé pour le phénotypage. Le tri est réalisé sur un trieur FACS-ALTRA (Beckman Coulter).

4.3. Cycle cellulaire

Les cellules sont récupérées, rincées puis fixées goutte à goutte avec une solution froide d'éthanol et conservées au moins 1 heure à -20°C. Après centrifugation et rinçage au PBS, les cellules sont marquées avec une solution d'Iodure de Propidium (Sigma) 50µg/ml et de RNase (Roche) 5µg/ml (qsp PBS) incubée 30 minutes à 2 heures à température ambiante avant d'être analysées par cytométrie de flux.

5. SUPERARRAYS

5.1. Extraction d'ARN (kit RNeasy Mini, Qiagen)

On prépare d'abord le tampon RLT (RLT 1% de β -Mercapto-éthanol) pour lyser les cellules sur glace que l'on aide en passant le lysat 10 fois dans une seringue de 1ml avec une aiguille 18G. On ajoute le même volume (300 μ l) d'éthanol 70% et on mélange bien à la pipette. On met la solution sur une colonne de silice (max 750 μ l) sur le disque qui retient les fragments > 200pb. On centrifuge le tube à 10 000rpm 15 secondes. On aspire le milieu dans le tube et on met 350 μ l de RW1 pour laver la colonne, on centrifuge 15 secondes à 12 000 rpm et on change le tube. On dépose 80 μ l de mix de DNase (10 μ l de DNase + 70 μ l de RDD) sur le disque puis on attend 15 minutes que ça s'imprègne puis on rince la colonne avec 350 μ l de RW1 5 minutes à température ambiante. On ajoute 500 μ l de RPE/Ethanol, on centrifuge et on aspire le milieu. On répète l'opération en centrifugeant 2 minutes et en aspirant le milieu. On centrifuge ensuite le tube à vide pour tout éliminer. On met les colonnes sur des nouveaux tubes on élue avec 40 μ l d'eau RNases free bien au milieu du disque et on attend 15 minutes, on centrifuge et on récupère le tube pour aller doser les échantillons au Nanodrop et la qualité des échantillons est vérifiée par puce à Agilent. On conserve les ARN à -80°C.

5.2. Technique de Superarrays (GEArray Q Serie (Bioscience))

2,2 μ g d'ARN sont prélevés et additionnés d'1 μ l de primer et qsp 10 μ l avec de l'eau distillée. Le cycle dans un thermocycler est de 3 minutes à 70°C puis 37°C pendant 10 minutes. On prépare le mix de RT (4 μ l de Tampon BN, 4 μ l d'H₂O Rnase free, 1 μ l de RNases inhibitor, 1 μ l de Reverse Transcriptase) qu'on fait chauffer 1 minute à 37°C. La réverse transcription se fait en ajoutant ce mix, en mélangeant à la pipette et on continue l'incubation pendant 25 minutes à 37°C et 5 minutes à 85°C et on met les tubes sur la glace. Après avoir ajouté et mélangé le mix LPR (18 μ l de tampon L, 9 μ l de tampon AF, 2 μ l de Biotin-16-dUTP et 1 μ l de DNA Polymerase) qui sert au marquage et

à l'amplification, on règle le thermocycler sur d'abord 5 minutes à 85°C puis 30 cycles à 85°C pendant 1 minute ; 50°C pendant 1 minute ; 72°C pendant 1 minute puis les échantillons sont laissés pendant 5 minutes à 72°C. Les échantillons sont dosés sur un Nanodrop et 10µg de cDNA sont prélevés pour la suite de l'expérience qui consiste d'abord en la dénaturation des échantillons 2 minutes à 94°C puis la réhydratation des membranes avec de l'eau déionisée et l'hybridation du cDNA dilué dans 750µl de solution GEA Hybridation (chauffée à 60°C pendant quelques heures avant) sur des membranes superarrays à 60°C pendant une nuit. Le lendemain les membranes sont lavées avec la solution 1 du kit (2X SSC, 1% SDS) pendant 15 minutes puis la solution 2 du kit (0,1X SSC, 0,5% SDS) pendant 15 minutes aussi. Pour la détection on place la solution Q pendant 1 heure sous agitation à 20-30 rpm puis la solution F 1X avec 2µl d'AP pendant 10 minutes sous 5-10 rpm. La série de lavages qui suit est composée de 4 lavages avec la solution F 1X pendant 5 minutes sous agitation lente puis deux fois avec la solution G avant d'ajouter 500µl d'ECF et de placer les membranes dans des pochettes plastiques pendant 5 minutes puis dans des pochettes propres pour acquérir les signaux sur le Storm 860.

PARTIE VII :

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Aberdam D (2004) Derivation of keratinocyte progenitor cells and skin formation from embryonic stem cells, *Int.J.Dev.Biol.*, 48, 203-206.
- Al Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 3983-3988.
- Alexandrescu DT, Kauffman CL and Dasanu CA (2009) Persistent hair growth during treatment with the EGFR inhibitor erlotinib, *Dermatol.Online.J.*, 15, 4-
- Alison MR and Islam S (2009) Attributes of adult stem cells, *J.Pathol.*, 217, 144-160.
- Allombert-Blaise C, Tamiji S, Mortier L, Fauvel H, Tual M, Delaporte E, Piette F, DeLassale EM, Formstecher P, Marchetti P and Polakowska R (2003) Terminal differentiation of human epidermal keratinocytes involves mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway, *Cell Death.Differ.*, 10, 850-852.
- Alonso L and Fuchs E (2003) Stem cells of the skin epithelium, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100 Suppl 1, 11830-11835.
- Amabile G and Meissner A (2009) Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine, *Trends Mol.Med.*, 15, 59-68.
- Ambler CA and Maatta A (2009) Epidermal stem cells: location, potential and contribution to cancer, *J.Pathol.*, 217, 206-216.
- Ando Y and Jensen PJ (1993) Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I enhance keratinocyte migration, *J.Invest Dermatol.*, 100, 633-639.
- Atit R, Conlon RA and Niswander L (2003) EGF signaling patterns the feather array by promoting the interbud fate, *Dev.Cell*, 4, 231-240.
- Bachelor MA and Bowden GT (2004) UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression, *Semin.Cancer Biol.*, 14, 131-138.
- Barrandon Y and Green H (1987) Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 84, 2302-2306.
- Barrandon Y and Green H (1987) Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor, *Cell*, 50, 1131-1137.
- Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, Zhu X, Humphrey PA, Friedman HS and Bigner DD (1995) Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-

- transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene, *Cell Growth Differ.*, 6, 1251-1259.
- BECKER AJ, McCULLOCH EA and TILL JE (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells, *Nature*, 197, 452-454.
 - Bickenbach JR and Chism E (1998) Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture, *Exp.Cell Res.*, 244, 184-195.
 - Bill HM, Knudsen B, Moores SL, Muthuswamy SK, Rao VR, Brugge JS and Miranti CK (2004) Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells, *Mol.Cell Biol.*, 24, 8586-8599.
 - Blanpain C and Fuchs E (2006) Epidermal stem cells of the skin, *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 22, 339-373.
 - Blanpain C, Horsley V and Fuchs E (2007) Epithelial stem cells: turning over new leaves, *Cell*, 128, 445-458.
 - Blanpain C and Fuchs E (2009) Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 10, 207-217.
 - Bode AM and Dong Z (2003) Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction, *Sci.STKE.*,2003, RE2-
 - Boman BM and Huang E (2008) Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology, *J.Clin.Oncol.*, 26, 2828-2838.
 - Boman BM and Wicha MS (2008) Cancer stem cells: a step toward the cure, *J.Clin.Oncol.*, 26, 2795-2799.
 - Boman BM, Fields JZ, Cavanaugh KL, Guetter A and Runquist OA (2008) How dysregulated colonic crypt dynamics cause stem cell overpopulation and initiate colon cancer, *Cancer Res.*, 68, 3304-3313.
 - Bonnet D and Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell, *Nat.Med.*, 3, 730-737.
 - Boyer MJ and Cheng T (2008) The CDK inhibitors: potential targets for therapeutic stem cell manipulations?, *Gene Ther.*, 15, 117-125.
 - Braun KM, Niemann C, Jensen UB, Sundberg JP, Silva-Vargas V and Watt FM (2003) Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation

- of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis, *Development*, 130, 5241-5255.
- Braun KM and Watt FM (2004) Epidermal label-retaining cells: background and recent applications, *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.*, 9, 196-201.
 - Braun KM (2008) Cutaneous cancer stem cells: beta-catenin strikes again, *Cell Stem Cell*, 2, 406-408.
 - Cai J, Weiss ML and Rao MS (2004) In search of "stemness", *Exp.Hematol.*,32, 585-598.
 - Campos LS (2004) Neurospheres: insights into neural stem cell biology, *J.Neurosci.Res.*, 78, 761-769.
 - Challen GA and Little MH (2006) A side order of stem cells: the SP phenotype, *Stem Cells*, 24, 3-12.
 - Chen CS, Lavker RM, Rodeck U, Risse B and Jensen PJ (1995) Use of a serum-free epidermal culture model to show deleterious effects of epidermal growth factor on morphogenesis and differentiation, *J.Invest Dermatol.*, 104, 107-112.
 - Chiba T, Miyagi S, Saraya A, Aoki R, Seki A, Morita Y, Yonemitsu Y, Yokosuka O, Taniguchi H, Nakauchi H and Iwama A (2008) The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.*, 68, 7742-7749.
 - Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL and Wahl GM (2006) Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells, *Cancer Res.*, 66, 9339-9344.
 - Coffey RJ, Jr., Goustin AS, Soderquist AM, Shipley GD, Wolfshohl J, Carpenter G and Moses HL (1987) Transforming growth factor alpha and beta expression in human colon cancer lines: implications for an autocrine model, *Cancer Res.*, 47, 4590-4594.
 - Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ and Maitland NJ (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells, *Cancer Res.*, 65, 10946-10951.
 - Congdon KL and Reya T (2008) Divide and conquer: how asymmetric division shapes cell fate in the hematopoietic system, *Curr.Opin.Immunol.*, 20, 302-307.

- Cook PW, Pittelkow MR and Shipley GD (1991) Growth factor-independent proliferation of normal human neonatal keratinocytes: production of autocrine- and paracrine-acting mitogenic factors, *J.Cell Physiol*, 146, 277-289.
- Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C and Clarke MF (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 104, 10158-10163.
- Dang CV, Kim JW, Gao P and Yustein J (2008) The interplay between MYC and HIF in cancer, *Nat.Rev.Cancer*, 8, 51-56.
- Degterev A and Yuan J (2008) Expansion and evolution of cell death programmes, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 9, 378-390.
- Doherty JM, Geske MJ, Stappenbeck TS and Mills JC (2008) Diverse adult stem cells share specific higher-order patterns of gene expression, *Stem Cells*, 26, 2124-2130.
- Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ and Wicha MS (2003) In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells, *Genes Dev.*, 17, 1253-1270.
- Dotto GP (2000) p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?, *Biochim.Biophys.Acta*, 1471, M43-M56.
- Dou J, Pan M, Wen P, Li Y, Tang Q, Chu L, Zhao F, Jiang C, Hu W, Hu K and Gu N (2007) Isolation and identification of cancer stem-like cells from murine melanoma cell lines, *Cell Mol.Immunol.*, 4, 467-472.
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev.*, 82, 47-95.
- Elias PM (2007) The skin barrier as an innate immune element, *Semin.Immunopathol.*, 29, 3-14.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A and Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature*, 391, 43-50.
- Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C and De Maria R (2008) Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population, *Cell Death.Differ.*, 15, 504-514.

- Essers MA, Offner S, Blanco-Bose WE, Waibler Z, Kalinke U, Duchosal MA and Trumpp A (2009) IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo, *Nature*, 458, 904-908.
- Evans RD, Perkins VC, Henry A, Stephens PE, Robinson MK and Watt FM (2003) A tumor-associated beta 1 integrin mutation that abrogates epithelial differentiation control, *J.Cell Biol.*, 160, 589-596.
- Evans RD, Jones J, Taylor C and Watt FM (2004) Sequence variation in the I-like domain of the beta1 integrin subunit in human oral squamous cell carcinomas, *Cancer Lett.*, 213, 189-194.
- Fernando P and Megeney LA (2007) Is caspase-dependent apoptosis only cell differentiation taken to the extreme ?, *FASEB J.*, 21, 8-17.
- Finkel T (2006) Cell biology: a clean energy programme, *Nature*, 444, 151-152.
- Frye M, Gardner C, Li ER, Arnold I and Watt FM (2003) Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment, *Development*, 130, 2793-2808.
- Fuchs E (2007) Scratching the surface of skin development, *Nature*, 445, 834-842.
- Fujita J, Crane AM, Souza MK, Dejosez M, Kyba M, Flavell RA, Thomson JA and Zwaka TP (2008) Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells, *Cell Stem Cell*, 2, 595-601.
- Fukui T, Ohe Y, Tsuta K, Furuta K, Sakamoto H, Takano T, Nokihara H, Yamamoto N, Sekine I, Kunitoh H, Asamura H, Tsuchida T, Kaneko M, Kusumoto M, Yamamoto S, Yoshida T and Tamura T (2008) Prospective study of the accuracy of EGFR mutational analysis by high-resolution melting analysis in small samples obtained from patients with non-small cell lung cancer, *Clin.Cancer Res.*, 14, 4751-4757.
- Garcia JA (2006) HIFing the brakes: therapeutic opportunities for treatment of human malignancies, *Sci.STKE.*, 2006, e25-
- Garlick JA and Taichman LB (1992) A model to study the fate of genetically-marked keratinocytes in culture, *J.Dermatol.*, 19, 797-801.
- Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Kofler M, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW and Ward CW (2003) The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors, *Mol.Cell*, 11, 495-505.
- Gonzalez C (2007) Spindle orientation, asymmetric division and tumour suppression in *Drosophila* stem cells, *Nat.Rev.Genet.*, 8, 462-472.

- Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Melhem MF, Endo S, Johnson DE, Huang L, He Y and Kim JD (2000) Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97, 4227-4232.
- Green DR and Beere HM (2000) Apoptosis. Gone but not forgotten, *Nature*, 405, 28-29.
- Grinstein E and Wernet P (2007) Cellular signaling in normal and cancerous stem cells, *Cell Signal.*, 19, 2428-2433.
- Gschwind A, Fischer OM and Ullrich A (2004) The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy, *Nat.Rev.Cancer*, 4, 361-370.
- Haake AR and Polakowska RR (1993) Cell death by apoptosis in epidermal biology, *J.Invest Dermatol.*, 101, 107-112.
- Hackett TL, Shaheen F, Johnson A, Wadsworth S, Pechkovsky DV, Jacoby DB, Kicic A, Stick SM and Knight DA (2008) Characterization of side population cells from human airway epithelium, *Stem Cells*, 26, 2576-2585.
- Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R and Balicki D (2006) SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations, *Exp.Cell Res.*, 312, 3701-3710.
- Hansen LA, Alexander N, Hogan ME, Sundberg JP, Dlugosz A, Threadgill DW, Magnuson T and Yuspa SH (1997) Genetically null mice reveal a central role for epidermal growth factor receptor in the differentiation of the hair follicle and normal hair development, *Am.J.Pathol.*, 150, 1959-1975.
- Haraguchi N, Satoh H, Ogawa R, Hashimoto Y and Sekizawa K (2005) Chemotherapy in a patient with small-cell lung cancer undergoing haemodialysis, *Clin.Oncol.(R.Coll.Radiol.)*, 17, 663-
- Herr A, Grutzmann R, Matthaei A, Artelt J, Schrock E, Rump A and Pilarsky C (2005) High-resolution analysis of chromosomal imbalances using the Affymetrix 10K SNP genotyping chip, *Genomics*, 85, 392-400.
- Honda A, Hirose M, Hara K, Matoba S, Inoue K, Miki H, Hiura H, Kanatsu-Shinohara M, Kanai Y, Kono T, Shinohara T and Ogura A (2007) Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 104, 12389-12394.
- Horsley V, Aliprantis AO, Polak L, Glimcher LH and Fuchs E (2008) NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells, *Cell*, 132, 299-310.

- Huang TS, Hsieh JY, Wu YH, Jen CH, Tsuang YH, Chiou SH, Partanen J, Anderson H, Jaatinen T, Yu YH and Wang HW (2008) Functional network reconstruction reveals somatic stemness genetic maps and dedifferentiation-like transcriptome reprogramming induced by GATA2, *Stem Cells*, 26, 1186-1201.
- Hynes NE and Lane HA (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors, *Nat.Rev.Cancer*, 5, 341-354.
- Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, Morris RJ and Cotsarelis G (2005) Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis, *Nat.Med.*, 11, 1351-1354.
- Jaenisch R and Young R (2008) Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming, *Cell*, 132, 567-582.
- Jaksch M, Munera J, Bajpai R, Terskikh A and Oshima RG (2008) Cell cycle-dependent variation of a CD133 epitope in human embryonic stem cell, colon cancer, and melanoma cell lines, *Cancer Res.*, 68, 7882-7886.
- Jang YY and Sharkis SJ (2007) A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche, *Blood*, 110, 3056-3063.
- Janne PA (2008) Challenges of detecting EGFR T790M in gefitinib/erlotinib-resistant tumours, *Lung Cancer*, 60 Suppl 2, S3-S9.
- Janzen V, Fleming HE, Riedt T, Karlsson G, Riese MJ, Lo CC, Reynolds G, Milne CD, Paige CJ, Karlsson S, Woo M and Scadden DT (2008) Hematopoietic stem cell responsiveness to exogenous signals is limited by caspase-3, *Cell Stem Cell*, 2, 584-594.
- Jensen KB and Watt FM (2006) Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: Lrig1 is a regulator of stem cell quiescence, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 103, 11958-11963.
- Jensen KB, Collins CA, Nascimento E, Tan DW, Frye M, Itami S and Watt FM (2009) Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis, *Cell Stem Cell*, 4, 427-439.
- Jetten AM and Harvat BL (1997) Epidermal differentiation and squamous metaplasia: from stem cell to cell death, *J.Dermatol.*, 24, 711-725.
- Johnson JR, Cohen M, Sridhara R, Chen YF, Williams GM, Duan J, Gobburu J, Booth B, Benson K, Leighton J, Hsieh LS, Chidambaram N, Zimmerman P and Pazdur R (2005) Approval summary for erlotinib for treatment of patients with locally

advanced or metastatic non-small cell lung cancer after failure of at least one prior chemotherapy regimen, *Clin.Cancer Res.*, 11, 6414-6421.

- Jones PH and Watt FM (1993) Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression, *Cell*, 73, 713-724.
- Jones PH, Simons BD and Watt FM (2007) Sic transit gloria: farewell to the epidermal transit amplifying cell ?, *Cell Stem Cell*, 1, 371-381.
- Jonge-Peeters SD, Kuipers F, de Vries EG and Vellenga E (2007) ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance, *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 62, 214-226.
- Jost M, Kari C and Rodeck U (2000) The EGF receptor - an essential regulator of multiple epidermal functions, *Eur.J.Dermatol.*, 10, 505-510.
- Karasek J, Smetana K, Hrdlicka A, Dubinin I, Hornak O and Ohelert W (1972) Nuclear and nucleolar ultrastructure during the late stages of normal human keratinocyte maturation, *Br.J.Dermatol.*, 86, 601-607.
- Kaur P and Li A (2000) Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells, *J.Invest Dermatol.*, 114, 413-420.
- Keith B and Simon MC (2007) Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer, *Cell*, 129, 465-472.
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br.J.Cancer*, 26, 239-257.
- Khavari TA and Rinn J (2007) Ras/Erk MAPK signaling in epidermal homeostasis and neoplasia, *Cell Cycle*, 6, 2928-2931.
- Kiel MJ, He S, Ashkenazi R, Gentry SN, Teta M, Kushner JA, Jackson TL and Morrison SJ (2007) Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU, *Nature*, 449, 238-242.
- Kim Y, Lee YS, Choe J, Lee H, Kim YM and Jeoung D (2008) CD44-epidermal growth factor receptor interaction mediates hyaluronic acid-promoted cell motility by activating protein kinase C signaling involving Akt, Rac1, Phox, reactive oxygen species, focal adhesion kinase, and MMP-2, *J.Biol.Chem.*, 283, 22513-22528.
- Knoblich JA (2008) Mechanisms of asymmetric stem cell division, *Cell*, 132, 583-597.

- Kobayashi T, Hashimoto K, Okumura H, Asada H and Yoshikawa K (1998) Endogenous EGF-family growth factors are necessary for the progression from the G1 to S phase in human keratinocytes, *J.Invest Dermatol.*, 111, 616-620.
- Kobiela K, Stokes N, de la CJ, Polak L and Fuchs E (2007) Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 104, 10063-10068.
- Kondo T, Setoguchi T and Taga T (2004) Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 101, 781-786.
- Koster MI, Huntzinger KA and Roop DR (2002) Epidermal differentiation: transgenic/knockout mouse models reveal genes involved in stem cell fate decisions and commitment to differentiation, *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.*, 7, 41-45.
- Krahn G, Leiter U, Kaskel P, Udart M, Utikal J, Bezold G and Peter RU (2001) Coexpression patterns of EGFR, HER2, HER3 and HER4 in non-melanoma skin cancer, *Eur.J.Cancer*, 37, 251-259.
- Lacouture ME (2006) Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors, *Nat.Rev.Cancer*, 6, 803-812.
- Lacouture ME and Melosky BL (2007) Cutaneous reactions to anticancer agents targeting the epidermal growth factor receptor: a dermatology-oncology perspective, *Skin Therapy.Lett.*, 12, 1-5.
- Lakshmi U and Verfaillie C (2005) Stem cell plasticity, *Blood Rev.*, 19, 29-38.
- Lavker RM, Miller S, Wilson C, Cotsarelis G, Wei ZG, Yang JS and Sun TT (1993) Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation, *J.Invest Dermatol.*, 101, 16S-26S.
- Lavker RM, Sun TT, Oshima H, Barrandon Y, Akiyama M, Ferraris C, Chevalier G, Favier B, Jahoda CA, Dhouailly D, Panteleyev AA and Christiano AM (2003) Hair follicle stem cells, *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.*, 8, 28-38.
- Lavker RM, Tseng SC and Sun TT (2004) Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle, *Exp.Eye Res.*, 78, 433-446.
- Lawson DA and Witte ON (2007) Stem cells in prostate cancer initiation and progression, *J.Clin.Invest*, 117, 2044-2050.
- Lechler T and Fuchs E (2005) Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin, *Nature*, 437, 275-280.

- Levi BP and Morrison SJ (2008) Stem cells use distinct self-renewal programs at different ages, *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 73, 539-553.
- Levy V, Lindon C, Harfe BD and Morgan BA (2005) Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis, *Dev.Cell*, 9, 855-861.
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF and Simeone DM (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells, *Cancer Res.*, 67, 1030-1037.
- Liao MJ, Zhang CC, Zhou B, Zimonjic DB, Mani SA, Kaba M, Gifford A, Reinhardt F, Popescu NC, Guo W, Eaton EN, Lodish HF and Weinberg RA (2007) Enrichment of a population of mammary gland cells that form mammospheres and have in vivo repopulating activity, *Cancer Res.*, 67, 8131-8138.
- Lippens S, Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P and Declercq W (2005) Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification, *Cell Death.Differ.*, 12 Suppl 2, 1497-1508.
- Liu B, Xia X, Zhu F, Park E, Carbajal S, Kiguchi K, DiGiovanni J, Fischer SM and Hu Y (2008) IKKalpha is required to maintain skin homeostasis and prevent skin cancer, *Cancer Cell*, 14, 212-225.
- Lonergan T, Bavister B and Brenner C (2007) Mitochondria in stem cells, *Mitochondrion.*, 7, 289-296.
- Lowry WE, Blanpain C, Nowak JA, Guasch G, Lewis L and Fuchs E (2005) Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells, *Genes Dev.*, 19, 1596-1611.
- Ma L, Sun B, Hood L and Tian Q (2007) Molecular profiling of stem cells, *Clin.Chim.Acta*, 378, 24-32.
- Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ and Guan XY (2007) Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells, *Gastroenterology*, 132, 2542-2556.
- Mackenzie IC and Bickenbach JR (1985) Label-retaining keratinocytes and Langerhans cells in mouse epithelia, *Cell Tissue Res.*, 242, 551-556.
- Mackenzie IC (1997) Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure, *J.Invest Dermatol.*, 109, 377-383.
- Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P, Huber M, Hohl D, Cano A, Birchmeier W and Huelsken J (2008) Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling, *Nature*, 452, 650-653.

- Malhotra S and Kincade PW (2009) Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis, *Cell Stem Cell*, 4, 27-36.
- Mammone T, Gan D, Collins D, Lockshin RA, Marenus K and Maes D (2000) Successful separation of apoptosis and necrosis pathways in HaCaT keratinocyte cells induced by UVB irradiation, *Cell Biol.Toxicol.*, 16, 293-302.
- McCall CA and Cohen JJ (1991) Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous endonuclease, *J.Invest Dermatol.*, 97, 111-114.
- McKeon F (2004) p63 and the epithelial stem cell: more than status quo ?, *Genes Dev.*, 18, 465-469.
- Mehra R, Cohen RB and Burtress BA (2008) The role of cetuximab for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck, *Clin.Adv.Hematol.Oncol.*, 6, 742-750.
- Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z and Derynck R (1995) Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor, *Nature*, 376, 337-341.
- Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochat A, Barrandon Y and De Bari C (2007) Stem cell niches in mammals, *Exp.Cell Res.*, 313, 3377-3385.
- Monzon RI, McWilliams N and Hudson LG (1996) Suppression of cornified envelope formation and type 1 transglutaminase by epidermal growth factor in neoplastic keratinocytes, *Endocrinology*, 137, 1727-1734.
- Morasso MI and Tomic-Canic M (2005) Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing, *Biol.Cell*, 97, 173-183.
- Moreb JS (2008) Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells, *Curr.Stem Cell Res.Ther.*, 3, 237-246.
- Morris RJ and Potten CS (1994) Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro, *Cell Prolif.*, 27, 279-289.
- Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA and Cotsarelis G (2004) Capturing and profiling adult hair follicle stem cells, *Nat.Biotechnol.*, 22, 411-417.
- Morrison SJ and Kimble J (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer, *Nature*, 441, 1068-1074.

- Murphy MJ, Wilson A and Trumpp A (2005) More than just proliferation: Myc function in stem cells, *Trends Cell Biol.*, 15, 128-137.
- Nanney LB, McKanna JA, Stoscheck CM, Carpenter G and King LE (1984) Visualization of epidermal growth factor receptors in human epidermis, *J.Invest Dermatol.*, 82, 165-169.
- Nanney LB, Stoscheck CM, King LE, Jr., Underwood RA and Holbrook KA (1990) Immunolocalization of epidermal growth factor receptors in normal developing human skin, *J.Invest Dermatol.*, 94, 742-748.
- Natarajan TG and FitzGerald KT (2007) Markers in normal and cancer stem cells, *Cancer Biomark.*, 3, 211-231.
- Nishikawa S and Osawa M (2007) Generating quiescent stem cells, *Pigment Cell Res.*, 20, 263-270.
- Nishikawa SI, Osawa M, Yonetani S, Torikai-Nishikawa S and Freter R (2008) Niche required for inducing quiescent stem cells, *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 73, 67-71.
- Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F and Salomon DS (2006) Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer, *Gene*, 366, 2-16.
- O'Hagan KA, Cocchiglia S, Zhdanov AV, Tambuwala MM, Cummins EP, Monfared M, Agbor TA, Garvey JF, Papkovsky DB, Taylor CT and Allan BB (2009) PGC-1alpha is coupled to HIF-1alpha-dependent gene expression by increasing mitochondrial oxygen consumption in skeletal muscle cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 106, 2188-2193.
- Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T and Yamanaka S (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors, *Science*, 322, 949-953.
- Okuyama R, Nguyen BC, Talora C, Ogawa E, Tommasi d, V, Lioumi M, Chiorino G, Tagami H, Woo M and Dotto GP (2004) High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism, *Dev.Cell*, 6, 551-562.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA and Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer, *EMBO J.*, 19, 3159-3167.
- Orford KW and Scadden DT (2008) Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation, *Nat.Rev.Genet.*, 9, 115-128.

- Owens DM and Watt FM (2003) Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours, *Nat.Rev.Cancer*, 3, 444-451.
- Park CY, Tseng D and Weissman IL (2009) Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic, *Mol.Ther.*, 17, 219-230.
- Parkinson EK (1992) Epidermal keratinocyte stem cells: their maintenance and regulation, *Semin.Cell Biol.*, 3, 435-444.
- Peus D, Hamacher L and Pittelkow MR (1997) EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation, *J.Invest Dermatol.*, 109, 751-756.
- Phinney DG and Prockop DJ (2007) Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views, *Stem Cells*, 25, 2896-2902.
- Polakowska RR and Haake AR (1994) Apoptosis: the skin from a new perspective, *Cell Death.Differ.*, 1, 19-31.
- Potten CS (2004) Keratinocyte stem cells, label-retaining cells and possible genome protection mechanisms, *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.*, 9, 183-195.
- Raaijmakers MH and Scadden DT (2008) Evolving concepts on the microenvironmental niche for hematopoietic stem cells, *Curr.Opin.Hematol.*, 15, 301-306.
- Radley JM, Ellis S, Palatsides M, Williams B and Bertoncello I (1999) Ultrastructure of primitive hematopoietic stem cells isolated using probes of functional status, *Exp.Hematol.*, 27, 365-369.
- Ramirez-Bergeron DL and Simon MC (2001) Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system, *Stem Cells*, 19, 279-286.
- Rappa G, Mercapide J, Anzanello F, Prasmickaite L, Xi Y, Ju J, Fodstad O and Lorico A (2008) Growth of cancer cell lines under stem cell-like conditions has the potential to unveil therapeutic targets, *Exp.Cell Res.*, 314, 2110-2122.
- Ratajczak MZ (2008) Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells, *Curr.Opin.Hematol.*, 15, 293-300.
- Repertinger SK, Campagnaro E, Fuhrman J, El Abaseri T, Yuspa SH and Hansen LA (2004) EGFR enhances early healing after cutaneous incisional wounding, *J.Invest Dermatol.*, 123, 982-989.

- Reya T and Clevers H (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer, *Nature*, 434, 843-850.
- Rheinwald JG and Green H (1977) Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes, *Nature*, 265, 421-424.
- Rheinwald JG, Jorgensen JL, Hahn WC, Terpstra AJ, O'Connell TM and Plummer KK (1987) Mesosecrin: a secreted glycoprotein produced in abundance by human mesothelial, endothelial, and kidney epithelial cells in culture, *J.Cell Biol.*, 104, 263-275.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C and De Maria R (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells, *Nature*, 445, 111-115.
- RICHARDS BM (1955) Deoxyribose nucleic acid values in tumour cells with reference to the stem-cell theory of tumour growth, *Nature*, 175, 259-261.
- Rodeck U, Jost M, Kari C, Shih DT, Lavker RM, Ewert DL and Jensen PJ (1997) EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival, *J.Cell Sci.*, 110 (Pt 2), 113-121.
- Sang L, Collier HA and Roberts JM (2008) Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1, *Science*, 321, 1095-1100.
- Sato K, Nagao T, Kakumoto M, Kimoto M, Otsuki T, Iwasaki T, Tokmakov AA, Owada K and Fukami Y (2002) Adaptor protein Shc is an isoform-specific direct activator of the tyrosine kinase c-*Src*, *J.Biol.Chem.*, 277, 29568-29576.
- Scaltriti M and Baselga J (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy, *Clin.Cancer Res.*, 12, 5268-5272.
- Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Sayegh MH and Frank MH (2008) Identification of cells initiating human melanomas, *Nature*, 451, 345-349.
- Schinkel AH and Jonker JW (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview, *Adv Drug Deliv Rev.*, 55, 3-29.
- Schneider MR, Werner S, Paus R and Wolf E (2008) Beyond wavy hairs: the epidermal growth factor receptor and its ligands in skin biology and pathology, *Am.J.Pathol.*, 173, 14-24.
- Schroeder T (2007) Asymmetric Cell Division in Normal and Malignant Hematopoietic Precursor Cells, *Cell Stem Cell*, 1, 479-481.

- Sell S (2004) Stem cell origin of cancer and differentiation therapy, *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 51, 1-28.
- Senoo M, Pinto F, Crum CP and McKeon F (2007) p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia, *Cell*, 129, 523-536.
- Sharom FJ (2008) ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance, *Pharmacogenomics.*, 9, 105-127.
- Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomes D and Tajbakhsh S (2006) Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells, *Nat.Cell Biol.*, 8, 677-687.
- Sibilina M and Wagner EF (1995) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor, *Science*, 269, 234-238.
- Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF and Szeder V (2004) Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle, *Dev.Dyn.*, 231, 258-269.
- Singh AB and Harris RC (2005) Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands, *Cell Signal.*, 17, 1183-1193.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J and Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors, *Cancer Res.*, 63, 5821-5828.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD and Dirks PB (2004) Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature*, 432, 396-401.
- Smith KP, Luong MX and Stein GS (2009) Pluripotency: toward a gold standard for human ES and iPS cells, *J.Cell Physiol*, 220, 21-29.
- Spradling A, Drummond-Barbosa D and Kai T (2001) Stem cells find their niche, *Nature*, 414, 98-104.
- Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G and Hochedlinger K (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration, *Science*, 322, 945-949.
- Stoll SW, Benedict M, Mitra R, Hiniker A, Elder JT and Nunez G (1998) EGF receptor signaling inhibits keratinocyte apoptosis: evidence for mediation by Bcl-XL, *Oncogene*, 16, 1493-1499.
- Tamiji S, Beauvillain JC, Mortier L, Jouy N, Tual M, Delaporte E, Formstecher P, Marchetti P and Polakowska R (2005) Induction of apoptosis-like mitochondrial

- impairment triggers antioxidant and Bcl-2-dependent keratinocyte differentiation, *J.Invest Dermatol.*, 125, 647-658.
- Tanemura A, Nagasawa T, Inui S and Itami S (2005) LRIG-1 provides a novel prognostic predictor in squamous cell carcinoma of the skin: immunohistochemical analysis for 38 cases, *Dermatol.Surg.*, 31, 423-430.
 - Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT and Lavker RM (2000) Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis, *Cell*, 102, 451-461.
 - Terunuma A, Kapoor V, Yee C, Telford WG, Udey MC and Vogel JC (2007) Stem cell activity of human side population and alpha6 integrin-bright keratinocytes defined by a quantitative in vivo assay, *Stem Cells*, 25, 664-669.
 - Tortora G, Ciardiello F and Gasparini G (2008) Combined targeting of EGFR-dependent and VEGF-dependent pathways: rationale, preclinical studies and clinical applications, *Nat.Clin.Pract.Oncol.*, 5, 521-530.
 - Vaillant F, Asselin-Labat ML, Shackleton M, Forrest NC, Lindeman GJ and Visvader JE (2008) The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis, *Cancer Res.*, 68, 7711-7717.
 - van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, Quirke P, Flejou JF, Plato HT, de Hertogh G, Jares P, Langner C, Hoefler G, Ligtenberg M, Tiniakos D, Tejpar S, Bevilacqua G and Ensari A (2008) KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program, *Virchows Arch.*, 453, 417-431.
 - Vardy DA, Kari C, Lazarus GS, Jensen PJ, Zilberstein A, Plowman GD and Rodeck U (1995) Induction of autocrine epidermal growth factor receptor ligands in human keratinocytes by insulin/insulin-like growth factor-1, *J.Cell Physiol*, 163, 257-265.
 - Veeramani S, Igawa T, Yuan TC, Lin FF, Lee MS, Lin JS, Johansson SL and Lin MF (2005) Expression of p66(Shc) protein correlates with proliferation of human prostate cancer cells, *Oncogene*, 24, 7203-7212.
 - Veeramani S, Yuan TC, Lin FF and Lin MF (2008) Mitochondrial redox signaling by p66Shc is involved in regulating androgenic growth stimulation of human prostate cancer cells, *Oncogene*, 27, 5057-5068.
 - Viale A, De Franco F, Orleth A, Cambiaghi V, Giuliani V, Bossi D, Ronchini C, Ronzoni S, Muradore I, Monestiroli S, Gobbi A, Alcalay M, Minucci S and Pelicci PG (2009) Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells, *Nature*, 457, 51-56.

- Visvader JE and Lindeman GJ (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions, *Nat.Rev.Cancer*, 8, 755-768.
- Waikel RL, Kawachi Y, Waikel PA, Wang XJ and Roop DR (2001) Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells, *Nat.Genet.*, 28, 165-168.
- Wang X, Ryter SW, Dai C, Tang ZL, Watkins SC, Yin XM, Song R and Choi AM (2003) Necrotic cell death in response to oxidant stress involves the activation of the apoptogenic caspase-8/bid pathway, *J.Biol.Chem.*, 278, 29184-29191.
- Wang Y and Armstrong SA (2008) Cancer: inappropriate expression of stem cell programs?, *Cell Stem Cell*, 2, 297-299.
- Watt FM (2004) Unexpected Hedgehog-Wnt interactions in epithelial differentiation, *Trends Mol.Med.*, 10, 577-580.
- Watt FM, Estrach S and Ambler CA (2008) Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion, *Curr.Opin.Cell Biol.*, 20, 171-179.
- Watt FM and Collins CA (2008) Role of β -catenin in Epidermal Stem Cell Expansion, Lineage Selection, and Cancer, *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*,
- Watt FM, Frye M and Benitah SA (2008) MYC in mammalian epidermis: how can an oncogene stimulate differentiation?, *Nat.Rev.Cancer*, 8, 234-242.
- Weber GF and Menko AS (2005) The canonical intrinsic mitochondrial death pathway has a non-apoptotic role in signaling lens cell differentiation, *J.Biol.Chem.*, 280, 22135-22145.
- Wicha MS (2006) Identification of murine mammary stem cells: implications for studies of mammary development and carcinogenesis, *Breast Cancer Res.*, 8, 109-
- Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lio P, Macdonald HR and Trumpp A (2008) Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair, *Cell*, 135, 1118-1129.
- Wu M, Kwon HY, Rattis F, Blum J, Zhao C, Ashkenazi R, Jackson TL, Gaiano N, Oliver T and Reya T (2007) Imaging hematopoietic precursor division in real time, *Cell Stem Cell*, 1, 541-554.
- Wysocki AB (1999) Skin anatomy, physiology, and pathophysiology, *Nurs.Clin.North Am.*, 34, 777-97, v.

- Yamashita YM, Mahowald AP, Perlin JR and Fuller MT (2007) Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division, *Science*, 315, 518-521.
- Yamashita YM (2009) Regulation of asymmetric stem cell division: spindle orientation and the centrosome, *Front Biosci.*, 14, 3003-3011.
- Yamazaki S and Nakauchi H (2009) Insights into signaling and function of hematopoietic stem cells at the single-cell level, *Curr.Opin.Hematol.*, 16, 255-258.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II and Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*, 318, 1917-1920.
- Yu X, Alder JK, Chun JH, Friedman AD, Heimfeld S, Cheng L and Civin CI (2006) HES1 inhibits cycling of hematopoietic progenitor cells via DNA binding, *Stem Cells*, 24, 876-888.
- Zanet J, Pibre S, Jacquet C, Ramirez A, de Alboran IM and Gandarillas A (2005) Endogenous Myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, endoreplication and stem cell amplification, *J.Cell Sci.*, 118, 1693-1704.
- Zenz R and Wagner EF (2006) Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors, *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 38, 1043-1049.
- Zhang J, He XC, Tong WG, Johnson T, Wiedemann LM, Mishina Y, Feng JQ and Li L (2006) Bone morphogenetic protein signaling inhibits hair follicle anagen induction by restricting epithelial stem/progenitor cell activation and expansion, *Stem Cells*, 24, 2826-2839.
- Zhao Y, Chen E, Li L, Gong B, Xie W, Nanji S, Dube ID and Hough MR (2004) Gene expression profiling in the inductive human hematopoietic microenvironment, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 323, 703-711.
- Zimmerman CM and Padgett RW (2000) Transforming growth factor beta signaling mediators and modulators, *Gene*, 249, 17-30.
- Zuba-Surma EK, Kucia M, Ratajczak J and Ratajczak MZ (2009) "Small stem cells" in adult tissues: very small embryonic-like stem cells stand up!, *Cytometry A*, 75, 4-13.

RESUME/SUMMARY

L'épiderme humain est un tissu en renouvellement constant où l'équilibre entre les cellules nouvellement formées et les cellules perdues par desquamation est maintenu par la division asymétrique des cellules souches produisant deux cellules filles différentes : l'une possédant la capacité de s'auto-renouveler et l'autre engagée dans la différenciation en plusieurs lignées cellulaires reconstituant l'épiderme et ses appendices. De récentes découvertes suggèrent que les cellules souches altérées, appelées cellules initiatrices de tumeur ou cellules souches cancéreuses, seraient à l'origine du développement tumoral. Par conséquent, l'éradication ciblée de ces cellules pourrait traiter les cancers. Nos études avaient pour but d'identifier et de caractériser les cellules souches cancéreuses dans des tumeurs de peau et d'évaluer l'implication de la voie de signalisation de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) dans le contrôle de leur auto-renouvellement et leur potentiel de différenciation. Nous avons trouvé de rares kératinocytes mitotiques avec une distribution asymétrique de l'EGFR et nous avons déterminé que sa présence à la surface était liée au destin normal ou cancéreux des cellules. Bien qu'essentiel pour la prolifération, la différenciation et la survie des cellules épithéliales, EGFR n'était pas présent à la surface des cellules aux propriétés de cellules souches comme la quiescence, leur compétence à produire des cellules filles fonctionnellement différentes, leurs potentiels de prolifération et de clonogénicité élevés, leur capacité à former des sphères et l'expression de marqueurs de cellules souches. Au contraire, les kératinocytes exposant l'EGFR ont acquis un phénotype plus différencié, démontrant que l'EGFR contrôle un basculement du compartiment de cellules souches à celui de cellules d'amplification transitoire. Ce basculement était associé avec des changements dans le profil d'expression de protéines du cycle cellulaire ou contrôlant la survie et la mitochondrie qui variaient entre les cellules normales et cancéreuses. A partir de nos résultats, nous proposons un modèle dans lequel EGFR fonctionne comme un déterminant du destin des kératinocytes qui équilibre entre la quiescence et la prolifération/différenciation des cellules souches épidermiques durant la mitose. Cet équilibre semble clairement mal fonctionner dans le cancer. Nous avons précédemment montré que la différenciation des kératinocytes partage certains aspects de la signalisation apoptotique et est stimulée par les ROS, nous proposons donc que l'acquisition de l'EGFR à la surface cellulaire active la prolifération cellulaire et par conséquent, la production des ROS. De façon importante, notre étude suggère fortement que les cellules EGFR négatives peuvent constituer le compartiment reproductif de la tumeur responsable du maintien et du développement tumoral, donc fournir un aperçu mécanistique de l'inefficacité des thérapies actuelles anti-EGFR.

MOTS CLES : EGFR, Cellules souches, Cancer

Human epidermis is a continuously renewing tissue where equilibrium between new born and lost cells is maintained by asymmetric division of stem cells producing two unequal daughter cells; one with the ability to perpetuate itself and another committed to differentiate into several cell lineages reconstituting epidermis and its appendages. Recent findings suggest that altered stem cells, called tumor initiating or cancer stem cells, are at the origin of tumor development. Accordingly, it is believed that targeted eradication of these cells, holds the promise to cure cancer. Our studies were design to identify and characterize cancer stem cells in skin tumors and to evaluate involvement of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) signalling pathway in controlling their self renewal and differentiation function. We found rare mitotic keratinocytes with asymmetrically distributed EGFR and determined that its prevalence on the surface was linked to normal and cancer cell fate. Although essential for epithelial cell proliferation, differentiation and survival, EGFR was not present on the surface of cells satisfying criteria for stem cells such as quiescence, competence to produce functionally distinct daughters, high proliferative and clonogenic potential, sphere formation ability and expression of stem cell markers. In contrast, keratinocytes displaying EGFR acquired a more differentiated phenotype, demonstrating that EGFR controls a switch from the stem to transient amplifying cell compartment. This switch was associated with changes in the expression profile of cell cycle, survival and mitochondria controlling proteins that varied between normal and cancer cells. Based on our findings, we propose a model in which EGFR functions as a determinant of keratinocytes fate that balances quiescence and proliferation/differentiation of epidermal stem cells during mitosis. This balance is clearly malfunctioning in cancer. Since, as we previously showed keratinocytes differentiation shares some aspects of apoptotic pathway and is stimulated by reactive oxygen species (ROS), we further propose that acquisition of EGFR on cell surface activates cell proliferation and consequently, ROS production. Importantly, our study strongly suggests that EGFR negative cells may constitute the tumor reproductive compartment responsible for tumor maintenance and development, thus providing mechanistic insights into the relative inefficacy of current anti-EGFR therapies.

KEYWORDS : EGFR, Stem Cells, Cancer
