

Cellules souches nerveuses et irradiations ionisantes

F. Lazarini^a, T. Roque^{bcde}, MA Mouthon^{bcde}, O. Feierstein CE, C. Haton^{bcde}, L. Rousseau^{bcde}, O. Etienne, A.^{bcde}, A. Mabondzo^f, P.M. Lledo^a, F. Boussin^{bcde}

^a Laboratory for Perception and Memory, Institut Pasteur and CNRS URA2182, Paris, France

^b CEA DSV iRCM, SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, F-92265 Fontenay-aux-Roses,

^c INSERM, U967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France ,

^d Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses,

^e Université Paris Sud, UMR 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France.

^f CEA, DSV, iBiTec-S, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, F91191 Gif-sur-Yvette,

Introduction

L'exposition à des radiations ionisantes durant la vie fœtale ou adulte entraîne le développement de différentes pathologies du cerveau, telles que des malformations, des retards mentaux, des altérations des capacités cognitives et des tumeurs. Une large part de ces pathologies semble dépendre de l'atteinte des cellules souches et des progéniteurs nerveux.

La neurogenèse s'effectue à partir de cellules souches nerveuses qui se différencient, via des progéniteurs restreints, pour générer les trois principaux types de cellules nerveuses, les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. Elle a lieu essentiellement au cours du développement, mais persiste encore dans des régions discrètes du cerveau adulte. Au contraire des cellules nerveuses différenciées, les progéniteurs neuronaux sont particulièrement radiosensibles : chez le fœtus murin, une irradiation de 2 Gy entraîne, dans les 4 heures, une apoptose massive des précurseurs corticaux, sans affecter les cellules différenciées (Nowak et coll., 2006). Une fraction des cellules souches résiste à cette irradiation et permet, dans les 24 heures, la reprise d'une neurogenèse efficace, les animaux irradiés restant viables à long terme. Nous avons montré que l'apoptose radio-induite concernait à la fois les progéniteurs en prolifération, mais aussi ceux déjà engagés dans un processus de différenciation post-mitotique, suggérant une sensibilité particulière de ces cellules, en partie indépendante de leur statut prolifératif (Nowak et coll., 2006). L'apoptose rapide et massive des progéniteurs nerveux pourrait être une des principales causes des anomalies de développement du cerveau consécutives à l'irradiation. Cependant elle permet d'éviter la survie de cellules mutées qui conserveraient d'importantes capacités de prolifération. L'apoptose représenterait, de ce fait, un mécanisme de prévention de tumeur particulièrement actif au cours de la neurogenèse, mais fortement régulé

lors des différentes étapes de la différenciation. La reprise de la neurogenèse consécutive à l'irradiation suggère notamment l'existence de mécanismes de régulation de l'apoptose et de la réparation de l'ADN, propres aux cellules souches en relation probable avec leur microenvironnement.

Il existe différents mécanismes de réparation de l'ADN qui se distinguent entre autre par leur fidélité. En ce qui concerne les cassures double-brin, la recombinaison homologue, qui recopie les séquences endommagées à partir de séquences homologues, semble plus fidèle que la recombinaison non-homologue (NHEJ) qui rassemble bout à bout les morceaux d'ADN. Néanmoins, la recombinaison homologue n'est principalement active que dans des cellules en prolifération. D'autres équipes ont déjà démontré l'importance de la recombinaison homologue pour les cellules CSPN, et de la recombinaison non-homologue pour les cellules différenciées au cours du développement du cerveau (Orii et al., 2006). La fiabilité de la transmission de l'information génétique à partir des cellules souches notamment au cours du développement, et la résistance des cellules souches à différents stress génotoxiques laissent supposer qu'en plus des systèmes de contrôle et d'élimination des cellules endommagées, différents mécanismes spécifiques assurent un maximum de fidélité à la réparation de leur ADN. Toutefois, l'existence de mécanismes spécifiques de régulation permettant de distinguer les cellules souches, en particulier les cellules souches nerveuses, des progéniteurs ou des cellules différenciées n'est pas démontrée.

Des neurones sont remplacés en permanence dans le bulbe olfactif (BO) et dans le gyrus denté de l'hippocampe chez l'adulte. Le BO est le premier relais central du traitement de l'information sensorielle en provenance des neurones récepteurs sensoriels, situés dans l'épithélium olfactif de la cavité nasale. La neurogenèse bulbaire adulte est un processus qui se déroule en plusieurs étapes, débutant par la division des cellules souches présentes dans la sous-ventriculaire bordant les ventricules latéraux. Les progéniteurs neuronaux issus de ces cellules souches entament ensuite une longue migration pour atteindre leur position finale dans le BO. Ils présentent d'abord une migration tangentielle en chaîne le long du flux rostral migratoire (FRM). Ensuite ils migrent radialement en dehors du FRM pour envahir les couches bulbaires. Ils s'installent alors dans la couche granulaire profonde, ou dans la couche périglomérulaire superficielle du bulbe, où ils s'intègrent fonctionnellement au réseau, en se différenciant en interneurons inhibiteurs GABAergiques ou dopaminergiques (revue dans Lazarini F & Lledo,

2011). De nombreuses données de la littérature démontrent que la neurogenèse adulte est régulée par les hormones, les neuromédiateurs et les stimuli sensoriels : la neurogenèse bulbaire est accrue par un environnement enrichi en odeurs et par l'apprentissage de nouvelles odeurs. La déprivation sensorielle olfactive la diminue.

La recherche effectuée dans le cadre de ce projet avait pour objectif la compréhension des mécanismes physiopathologiques conduisant au développement de différentes pathologies du système nerveux consécutives à une irradiation accidentelle ou thérapeutique et d'aborder un certain nombre d'aspects fondamentaux concernant la biologie des cellules souches nerveuses en situation normale ou pathologique en utilisant le stress radiatif. Ainsi, la signification fonctionnelle de la neurogenèse adulte n'est pas encore clairement comprise. La neurogenèse adulte est dépendante de l'activité sensorielle, ce qui suggère qu'elle interviendrait dans la physiologie du BO chez l'adulte. Pour élucider le rôle de la neurogenèse bulbaire adulte, nous avons réalisé des expériences de perte de fonction : La neurogenèse bulbaire adulte a été bloquée par l'irradiation de la zone sous-ventriculaire du cerveau chez la souris.

Matériels et Méthodes

Réponse des cellules souches et progéniteurs nerveux fœtaux à l'irradiation

Des embryons de souris sauvages, p21^{-/-} ou rd54^{-/-} ont été irradiés in utero à E14.5. à l'aide d'un irradiateur au Césium (IBL). Les femelles gestantes ont reçu, avant ou après l'irradiation suivant les protocoles, différentes injections intrapéritonéales de deux analogues de nucléosides l'EDU et le BrdU afin de suivre la progression du cycle cellulaire des cellules souches nerveuses. Des coupes corticales ont ensuite effectuées à différents temps afin d'analyser les conséquences de l'irradiation. L'apoptose a été quantifiée par marquage Tunel, détection de la caspase 3 clivée et des noyaux pycnotiques. Les cellules souches nerveuses et progéniteurs ont été caractérisés à l'aide de différents anticorps spécifiques par immunofluorescence.

Conséquences de l'irradiation sur la neurogenèse adulte

Des souris mâles ou femelles adultes ont été irradiés, sous anesthésie générale, sur une table de stéréotaxie à 1 Gy/min par un irradiateur médical Alcyon (Cobalt). La tête ou seulement la zone subventriculaire ont été irradiés en protégeant le reste du corps par un cache en plomb. L'irradiation limitée à la zone subventriculaire a été rendue possible par une fenêtre de 3x11

millimètres dans le cache en plomb et placée au dessus de cette zone. Des souris témoins ont été transportées en salle d'irradiation et ont reçu l'anesthésie seulement. Après chaque expérience, les souris ont été réveillées par l'injection d'Antipamizole par voie intrapéritonéale. Les conséquences pour les cellules souches ont été analysées sur coupe histologiques à l'aide méthodes similaires à celles utilisées pour les embryons

Le blocage pharmacologique de la voie TGF β /Smad3 a été obtenu par administration intraveineuse d'un anticorps neutralisant le TGF β ou intra-nasale d'un inhibiteur sélectif du récepteur au TGF β /Alk5, le SB-505124 (Sigma). Les administrations ont été répétées 3 fois sur 5 jours.

L'interaction sociale et les performances olfactives des animaux irradiés (trois doses de 5 Gy (soit une dose totale de 15 Gy) appliquée à la zone subventriculaire toutes les 48 heures) ont été évaluées par des essais comportementaux basés sur des paradigmes non opérants (tests d'habituation et de deshabituation), ou opérants en utilisant un olfactomètre automatisé.

Résultats

Absence d'arrêt en G1/S dans les cellules souches nerveuses fœtales irradiées in utero.

En réponse à des dommages à l'ADN l'induction des checkpoints G1/S, S et G2/M du cycle cellulaire est supposée laisser du temps à la cellule cyclante pour réparer ou au contraire être éliminée lorsqu'elle est trop endommagée. Nous avons donc étudié la progression du cycle cellulaire des cellules souches nerveuses dans le cortex embryonnaire murin après une irradiation in utero. Nous avons mis en place un protocole d'étude sur coupes coronales basé sur des injections intrapéritonéales chez la mère de deux analogues nucléoside marqués par des fluorochromes distincts à différents temps avant et après l'irradiation. Nous avons ainsi démontré que les cellules souches nerveuses mettaient place les checkpoints S et G2/M associés à un niveau d'apoptose dépendant de la dose et de la phase au cours de laquelle les cellules avaient été irradiées : les cellules irradiées en G2 entrant pratiquement toutes en apoptose dans les 4 heures suivant une irradiation de 2Gy. En revanche, nous avons démontré que de manière très surprenante les radiations ionisantes n'induisent pas de checkpoint G1/S dans les cellules souches et progéniteurs nerveux au cours développement cortical (Roque et coll. sous presse).

Le gène p21 (Waf1, CDKN1A) code une kinase impliquée dans le contrôle de la transition G1-S au cours du cycle cellulaire (Harper et coll., 1993), notamment dans la réponse des cellules aux rayonnements ionisants. Son expression est régulée au niveau transcriptionnel par la protéine p53 (El-Deiry et coll., 1993), dont elle serait l'effecteur majeur pour la régulation du cycle cellulaire. Grâce à l'utilisation de souris p21^{-/-}, nous avons tout d'abord mis en évidence un rôle pro-apoptique de la p21 dans les précurseurs nerveux en migration après une irradiation (Roque et coll, sous presse). En revanche, nous avons confirmé l'absence d'induction de checkpoint G1/S dans les cellules souches nerveuses. En effet, l'entrée en S des cellules souches nerveuses irradiées n'est pratiquement pas ralentie aussi bien dans les souris déficientes pour p21 que sauvages par rapport aux souris non irradiées. En revanche dans les deux cas l'irradiation entraîne l'activation de checkpoints S dans ces cellules. Il est important de noter qu'in vitro l'irradiation entraîne un arrêt en G1 dans les cultures primaires des cellules souches nerveuses. Cette observation démontre le rôle majeur du micro-environnement et de l'organisation très particulière du cortex en développement pour les cellules souches nerveuses.

Importance de la recombinaison homologue pour les cellules souches nerveuses fœtales irradiées.

Afin d'étudier l'importance de la recombinaison nous avons utilisé le modèle classiquement utilisé de souris déficientes pour la protéine Rad54 qui joue un rôle important dans la recombinaison homologue en stimulant Rad51 et en concourant à la fidélité de la réparation (Essers et coll., 2002). Les souris rad54^{-/-} sont viables, au contraire des souris déficientes pour les autres gènes essentiels de la recombinaison homologue, mais présentent une sensibilité accrue aux radiations ionisantes et à différents stress génotoxiques. Nos résultats ont montré que la déficience en Rad54, qui n'a aucune conséquences pour le développement cortical en conditions normales, entraînait une très forte augmentation de l'apoptose radio-induite des cellules souches et progéniteurs nerveux dans le cerveau d'embryons de souris irradiées in utero. Cette augmentation d'apoptose était principalement liée à l'apoptose de toutes les cellules souches et progéniteurs irradiés en phase S et G2/M, même à faibles doses (0.5Gy). Cette apoptose était précédée d'un long blocage du cycle cellulaire lié à l'activation des checkpoints intra-S et G2/M. En revanche, ni les précurseurs neuronaux post-mitotiques, ni les cellules souches et progéniteurs irradiés en G1 n'étaient affectés par l'absence de Rad54, y compris les

cellules entrant en S juste après l'irradiation, suggérant que l'importance de la recombinaison homologue dépendant de Rad54 est déterminée par la phase du cycle au moment de l'irradiation (Rousseau et coll. soumis).

De manière intéressante nous avons observé que la mort des cellules irradiées en S entraîne dans les heures qui suivent l'irradiation, une réorientation des cellules irradiées en G1 vers l'autorenouvellement plutôt que la production neuronale suggérant la mise en place de mécanismes de régulations spécifiques.

Importance du microenvironnement pour les conséquences de l'irradiation sur la neurogenèse adulte.

Une irradiation de 2 à 4 Gy entraîne dans les heures suivantes une inhibition transitoire de la neurogenèse dans le cerveau de souris adultes ; sa reprise s'accompagne d'une phase de prolifération particulièrement intense des progéniteurs nerveux. Une analyse protéomique de l'évolution de la zone subventriculaire au cours de ces différentes phases nous a permis d'identifier les variations de l'expression de différentes protéines impliquées dans les mécanismes de prolifération des cellules souches (Chevalier et coll., sous presse). Un certain nombre d'entre-elles sont impliquées dans le métabolisme et la réponse au stress oxydatif, suggérant un rôle de ce dernier dans l'entrée en cycle de cellules souches nerveuses quiescentes.

Nous avons par ailleurs montré que la neurogenèse adulte était fortement et durablement altérée chez la souris après une exposition du cerveau à une dose totale de 15 Gy en 3 fractions. La survie inattendue à long terme des cellules souches nerveuses dans les cerveaux irradiés suggère que l'inhibition radio-induite de la neurogenèse résulte des altérations de leur microenvironnement, plutôt que d'un effet direct de l'irradiation sur les cellules souches. Nous avons ainsi retrouvé une augmentation persistante de l'expression de la TGFbeta dans les zones de neurogenèse adulte après l'irradiation, en particulier dans les microvaisseaux. Cette augmentation est associée à une élévation de son récepteur sur les cellules souches nerveuses. L'administration d'agents bloquant la voie TGF-beta nous a permis de stimuler la prolifération des cellules souches et de restaurer en partie la neurogenèse dans le cerveau de souris adultes irradiées (Pineda et coll. soumis).

Conséquences fonctionnelles de l'ablation radio-induites de la neurogenèse bulbaire adulte.

Nous avons observé que l'irradiation limitée à la zone sous ventriculaire à une dose totale de 15 Gy en 3 fractions mène à une suppression forte et durable (plus de 7 mois) de la neurogenèse dans le secteur irradié. La quantité de cellules positives pour la doublecortine, marqueur des neuroblastes, est diminuée de plus de 60% à la fois dans la zone sous-ventriculaire, zone irradiée, et dans le bulbe olfactif, zone non irradiée. De même, le nombre de cellules positives pour la doublecortine est fortement diminué (70 %) dans le gyrus dentelé de souris ayant été irradiées uniquement dans cette région. Ces résultats ont été confirmés par l'injection ponctuelle de BrdU qui marque les cellules en division peu après l'injection. Onze jours après l'injection par voie intrapéritonéale de BrdU, le nombre de cellules positives pour le BrdU, et donc âgées de 11 jours, est fortement réduit dans le bulbe olfactif des souris préalablement irradiées dans la. Ce nombre est également fortement diminué dans le gyrus dentelé des souris irradiées focalement dans la zone sous granulaire du gyrus dentelé. En résumé, nous avons démontré que l'irradiation locale de la zone sous-ventriculaire altère de manière durable et significative la neurogenèse bulbaire, réduisant fortement la proportion et le développement de nouveaux neurones dans le BO (Lazarini et al., 2009 ; Feierstein et al., 2010).

Discussion

L'ensemble de nos recherches a visé par différentes approches à permettre une meilleure connaissance des conséquences biologiques et cliniques de l'irradiation du cerveau en développement et adulte. La détermination des mécanismes de régulation et de la diversité des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN et de l'apoptose des CSPN présente à la fois un intérêt fondamental et une très grande importance pour le développement de stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation des cellules souches nerveuses contre différentes pathologies du SNC. Ces différentes démarches devraient aussi permettre d'identifier certains mécanismes d'oncogenèse impliquant une atteinte des CSPN. L'identification des facteurs sécrétés par les cellules endothéliales et capables de contrôler la neurogenèse pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour différentes pathologies du système nerveux. Enfin, nos travaux ainsi que les résultats d'autres laboratoires montrent que la neurogenèse olfactive est nécessaire pour la maintenance des circuits neuronaux du BO (Imayoshi et al., 2008), pour l'optimisation des fonctions olfactives liées aux réponses innées (Valley et al., 2009 ; Sakamoto et al., 2011), et pour la discrimination olfactive et la mémoire.

Réponse des cellules souches et progéniteurs nerveux fœtaux à l'irradiation

Il a déjà été montré que la durée de la phase G1 joue un rôle prépondérant dans la détermination du choix entre prolifération et différenciation des cellules souches nerveuses. L'allongement de leur phase G1 est ainsi une condition à la fois nécessaire et suffisante pour induire leur différenciation. Les mécanismes contrôlant la prolifération de ces cellules en régulant la longueur de la phase G1 semblent donc prévenir l'induction de l'arrêt en G1 en réponse à un stress génotoxique. L'absence de checkpoint G1/S contribuerait ainsi à la reconstitution rapide de leur stock après l'irradiation. Nous cherchons à caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu dans ce modèle particulier de réponse aux dommages à l'ADN. Notamment le rôle différents facteurs de transcription *olig2*, *Bmi1*, *RunX* présents dans les cellules souches nerveuses et capables de réprimer la *p21*, ainsi que de la voie *notch*.

Il est intéressant d'observer que l'absence de checkpoint G1/S des cellules souches nerveuses fait que ces cellules se distinguent très nettement des autres cellules somatiques par leur réponse à des dommages à l'ADN, comme cela a pu être décrit précédemment pour les cellules ES. La perte de l'arrêt en G1/S est une des caractéristiques fréquentes des cellules cancéreuses jouant un rôle majeur dans le développement de la maladie. Nos résultats suggèrent donc que des mécanismes similaires à ceux mis en place par les cellules souches normales soient responsables de l'absence d'arrêt en G1 dans certaines cellules cancéreuses notamment chez lesquelles la *p53* n'est pas mutée.

Nous avons par ailleurs montré que *Rad54* n'est pas utile aux cellules souches ou les progéniteurs nerveux en conditions normales, alors que la réparation des dommages à l'ADN subies par les cellules exposées à des radiations ionisantes en phase S ou G2 requiert absolument la recombinaison homologue dépendant de *Rad54*. Bien que nous ayons montré que de nombreuses cellules irradiées en G1 entrent en S après l'irradiation sans être totalement réparées, cette voie de réparation ne conditionne pas leur survie. Plus que la nature de la cellule, la phase du cycle au moment de l'irradiation conditionne donc l'utilisation de cette voie de réplication.

Nous avons en outre mis en évidence dans les souris *rad54*^{-/-} une réorientation accrue des cellules irradiées en G1 vers l'autorenouvellement plutôt que la différenciation, afin de contrebalancer la perte des cellules irradiées en S et G2 et reconstituer le pool de cellules souches et progéniteurs nerveux. Ces souris représentent donc un modèle intéressant pour la

caractérisation des mécanismes intrinsèques et extrinsèques conditionnant le devenir des cellules souches nerveuses au cours du développement.

L'inhibition à long terme de la neurogenèse adulte est liée à une altération du micro-environnement des cellules souches nerveuses

L'inhibition persistante de la neurogenèse adulte dans le cerveau murin consécutive à une seule irradiation à très forte dose (10 Gy) a été attribuée à l'activation de cellules microgliales. Nous avons montré que la répétition de dose plus faibles (5Gy) entraînait aussi une inhibition persistante de la neurogenèse, résultant aussi d'une altération du micro-environnement des cellules souches, mais n'impliquant pas les cellules microgliales. Au contraire, nous avons identifié l'implication majeure du TGF β produit par l'endothélium vasculaire irradié dans cette inhibition. D'un point de vue thérapeutique, nos résultats sur le blocage de la voie TGF β apportent des perspectives pour l'amélioration de la prise en charge des patients pour lesquels l'exposition à des radiations ionisantes des zones de neurogenèse ne peut être évitée au cours de radiothérapie

Nos travaux montrent que l'irradiation de la zone sous-ventriculaire entraîne une très forte réduction de la neurogenèse olfactive ainsi que des altérations de la mémoire olfactive (Lazarini et al., 2009) et de l'interaction sociale (Feierstein et al., 2010). Nous avons été les premiers à identifier un rôle de la neurogenèse bulbaire dans la mémoire à long terme des odeurs (discuté dans Lazarini & Lledo, 2011). L'étude du modèle murin expérimental de l'encéphalomyélite allergique expérimentale, ou EAE où la neurogenèse bulbaire est fortement réduite nous a permis tout récemment de confirmer le lien entre neurogenèse et mémoire olfactive (Tepavcevic et coll., 2011). Ces altérations de la mémoire olfactive, observés dans deux modèles différents, souris irradiées ou avec EAE, indiquent que la neurogenèse bulbaire a un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire des odeurs. Ce rôle a été récemment confirmé par une autre équipe qui a utilisé un modèle d'inhibition de la neurogenèse par infusion dans la ZSV d'un agent antimitotique (Sultan et al., 2010) et un modèle d'inhibition du turnover des nouveaux neurones olfactifs (Sultan et al., 2011). La neurogenèse adulte pourrait contribuer à la consolidation et la restitution des traces olfactives. Des expérimentations sont en cours afin d'élucider les mécanismes en jeu dans l'encodage et la restitution de l'information olfactive.

PUBLICATIONS

- Roque T, Haton C, Etienne O, Chicheportiche A, Rousseau L, Martin L, Mouthon MA, Boussin FD. Lack of a p21(waf1/cip) -Dependent G1/S Checkpoint in Neural Stem and Progenitor Cells After DNA Damage in vivo. *Stem Cells*. 2011 Dec 12. doi: 10.1002/stem.1010. [Epub ahead of print]
- Rousseau L., Etienne O., Roque T., Desmaze C., Haton C., Mouthon MA, Bernardino-Sgherrib J., Essers J., Kanaarf R., Boussin FD. In vivo importance of homologous recombination DNA repair for mouse neural stem and progenitor cells, soumis
- Chevalier F., Chicheportiche A., Daynac M., Depagne J., Bertrand P., Boussin F. D., Mouthon MA. Identification of factors involved in neurogenesis recovery after irradiation of the adult mouse subventricular zone: a preliminary study, *Proteomics - Human Diseases and Protein Functions* (Intech book).
- Pineda JR, Daynac M., Chicheportiche A., Sii Felice K., Cebrian A., Garcia-Verdugo JM, Boussin D and Mouthon MA. Vascular –derived adult stem cells neurogenic niches perturbs neurogenesis during aging and irradiation (soumis).
- Lazarini F, Mouthon MA, Gheusi G, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Lamarque S, Abrous DN, Boussin FD, Lledo PM. Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS One*. 2009 Sep 15;4(9):e7017.
- Feierstein CE, Lazarini F, Wagner S, Gabellec MM, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Boussin FD, Lledo PM, Gheusi G. Disruption of Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb Affects Social Interaction but not Maternal Behavior. *Front Behav Neurosci*. 2010 Dec 1;4:176.
- Lazarini F, Lledo PM. Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends Neurosci*. 2011 Jan;34(1):20-30.