

# Effets des rayonnements ionisants sur les kératinocytes de l'épiderme humain

**MT Martin<sup>1</sup>, W Rachidi<sup>2</sup>, L Sabatier<sup>3</sup>, J Lamartine<sup>4</sup>.**

<sup>1</sup>CEA, iRCM, Laboratoire de Génomique et Radiobiologie de la Kératinopoïèse, 2 Rue G. Crémieux, Evry, F-91057, Evry cedex. <sup>2</sup> INAC/SCIB/LAN, CEA de Grenoble, 17 Rue des Martyrs, F-38054, Grenoble. <sup>3</sup> Laboratoire de Radiobiologie et Oncologie, 33, route de Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses. <sup>4</sup>Université Lyon 1, Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, CNRS, UMR5534, F-69003, Villeurbanne, F-69622.

## I. Enjeux et problématique, état de l'art

La majorité des tumeurs humaines est d'origine épithéliale. Parmi ces tumeurs épithéliales, les carcinomes de la peau sont les plus fréquents des cancers. Il y a 100 000 nouveaux cas annuels en France. On distingue les carcinomes baso-cellulaires (BCC), qui ont un développement local, et les carcinomes épidermoïdes ou spino-cellulaires (SCC), qui posent les plus graves problèmes thérapeutiques car ils peuvent donner lieu à des métastases. Il est classiquement proposé que la cible majeure des cancérigènes dans l'épiderme soit les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme et plus particulièrement les cellules souches (Morris et al., 2004). Dans la peau humaine, un réservoir important de cellules souches se situe dans la couche la plus profonde de l'épiderme, appelée couche basale, qui assure le renouvellement de l'épiderme tout au long de la vie de l'individu. La descendance immédiate des cellules souches, appelée kératinocytes progéniteurs, assure le renouvellement à court terme de l'épiderme, sur un cycle de 28 jours. Ces progéniteurs prolifèrent dans la couche basale puis ils migrent dans les couches supérieures épineuse et granuleuse, où ils se différencient. Certains auteurs ont proposé que les kératinocytes souches soient à l'origine des BCC, alors que les progéniteurs seraient à l'origine des SCC (Sell, 2004).

La peau humaine est une cible majeure de l'irradiation ionisante de part sa localisation anatomique (Barnett et al., 2009; Trotti et al., 2000) et plus particulièrement l'épiderme à cause de son renouvellement constant. Une réaction précoce peut se développer dans les premières semaines après l'exposition, qui se caractérise par une desquamation de l'épiderme, une inflammation locale, voir une ulcération de la peau pour les patients les plus radiosensibles. Les dommages tardifs sont essentiellement de deux types : les séquelles non cancéreuses dans les tissus sains (Delanian et al., 2007; Martin et al., 2000) et les tumeurs cutanées. Bien que divers types de tumeurs cutanées aient été décrits après irradiation, ce sont les tumeurs épithéliales de type carcinomes baso et spinocellulaires qui prédominent, dans un rapport 10/1 en faveur des premiers (Shore et al., 2001). La fréquence élevée des épithéliites précoces et des carcinomes tardifs radio-induits a conduit la CIPR <sup>1</sup> à définir **le kératinocyte comme la cellule à risque** pour le tissu cutané en général. Mais l'origine cellulaire précise des carcinomes radio-induits n'est pas connue car il n'existait pas de marqueurs spécifiques des populations basales et donc il était impossible d'isoler les kératinocytes progéniteurs et les kératinocytes souches. De même, la radiosensibilité de ces types cellulaires n'a pas été définie, même après une dose thérapeutique standard. Les découvertes récentes de la biologie des kératinocytes permettent aujourd'hui de proposer l'étude de la radiosensibilité de ces cellules à chaque stade de leur différenciation. Bien qu'il n'y ait pas de marqueur unique, une combinaison de marqueurs membranaires peut être utilisée pour trier les kératinocytes souches et progéniteurs par cytométrie de flux afin de les isoler de la population totale des kératinocytes de la peau humaine, majoritairement constituée de cellules différenciées.

Notre projet dans le contrat BIRAD consistait à étudier le rôle des deux populations cellulaires de la couche basale de l'épiderme dans les processus précoces du développement des carcinomes radio-induits. Dans ce but, **nous avons comme objectif de caractériser la radiosensibilité des 2 populations, leur potentiel de réparation des**

---

<sup>1</sup> ICRP : International Commission of Radiological Protection

**lésions de l'ADN et leur stabilité génomique à long terme.** Ces réponses cellulaires devaient être dans un premier temps caractérisées après la dose thérapeutique standard de 2 Gy, puis après une faible dose de 10 mGy. L'approche proposée était entièrement nouvelle, elle n'avait fait l'objet d'aucune publication dans la littérature. Elle permettait de bénéficier des compétences complémentaires de trois équipes, l'une spécialisée en biologie des cellules souches (Evry), la seconde en réparation de l'ADN (Grenoble) et la troisième en cytogénétique (Fontenay).

Le projet BIRAD était centré autour de deux doses. La dose de 2 Gy est un standard, c'est la dose délivrée par fraction en radiothérapie. Les études à 2 Gy devaient donc permettre de positionner la réponse des kératinocytes aux données connues de la littérature par rapport à d'autres types de cellules, souches ou différenciées. La dose de 10 mGy est une très faible dose. Bien qu'il n'existe pas de consensus, il est souvent proposé que les doses faibles soient celles qui sont inférieures à 100 mGy, les très faibles doses étant inférieures à 20 mGy. **Pour rappeler quelques ordres de grandeur, l'irradiation naturelle avoisine en France 1 à 2 mGy par an et elle varie entre 1 et 80 mGy/an dans le monde, alors qu'un examen radiologique peut entraîner une dose de 0,1 à 20 mGy.** Apparue dans les années 1960, la radiologie interventionnelle a révolutionné la prise en charge thérapeutique d'un nombre croissant de pathologies, car elle permet de guider un geste thérapeutique par une imagerie (angiographie, scanner, échographie, IRM). Mais cette pratique est associée à une exposition aux rayonnements ionisants délivrés par les appareils d'imagerie.

Les effets des faibles doses d'irradiation ionisante sont mal connus et leur impact en santé publique est un objet de débats. Les études épidémiologiques ne décèlent aucun effet cancérigène pour des doses inférieures à 100 mGy, et il n'existe pas aujourd'hui de marqueurs fiables. Pourtant, une réponse biologique a pu être observée, par exemple une induction de gènes par le groupe de J Little (Azzam et al., 2003) et par notre groupe (Franco et al., 2005), ou bien une phosphorylation de l'histone H2AX-g (Rothkamm et al., 2003). Parmi les phénomènes discutés aujourd'hui pour les effets des faibles et très faibles doses, citons l'induction de tumeurs, l'hypersensibilité aux faibles doses, la réponse adaptative et les effets collatéraux dans les cellules environnant la cellule irradiée. L'existence de seuil pour les effets des faibles doses est également en débat, par exemple pour les systèmes de réparation de l'ADN. En particulier, les très faibles doses ne provoqueraient pas d'induction des systèmes de réparation (doses inférieures à 20 mGy), alors que les faibles doses (supérieures à 20 mGy) induiraient cette activité (Tubiana et al., 2005).

Le groupe de Lyon avait le projet d'étudier les effets des faibles doses sur des kératinocytes différenciés. Ces cellules, situées dans les couches supérieures de l'épiderme, ne sont pas des cibles de la cancérogenèse. Mais elles peuvent être utilisées pour rechercher de nouveaux marqueurs d'exposition pour des applications bio-dosimétriques. Il est en effet possible de prélever les premières couches de l'épiderme par arrachage successif (*tape stripping*), ce qui est une technique moins invasive qu'une biopsie pour obtenir un échantillon biologique cutané. Cette technique peut être appliquée à plusieurs endroits de l'individu et à plusieurs temps après une exposition. Par ailleurs, les poils et les cheveux peuvent être une source d'ARN ou d'ADN de kératinocytes facile à prélever chez un irradié. L'objectif de ce groupe était de trouver de nouveaux marqueurs d'exposition à 10 mGy et d'étudier le rôle du facteur de transcription GATA3, que nous avons préalablement trouvé impliqué dans la réponse des kératinocytes différenciés à 10 mGy (Franco et al., 2005).

## II. Matériel et méthodes

Les matériels et méthodes utilisées ont fait appel à des tests classiques mais aussi à deux approches originales : les puces d'activités de réparation de l'ADN à Grenoble et les microcultures clonales de kératinocytes à Evry. Ces deux techniques ont fait l'objet de dépôt de brevets, celui d'Evry a été déposé au cours du projet BIRAD.

## Matériel cellulaire

La majorité des études développées à Evry, Fontenay et Grenoble a utilisé des populations cellulaires enrichies en cellules souches et en progéniteurs, directement isolées de peau humaine normale. Plusieurs techniques d'enrichissement sont couramment utilisées à Evry (Larderet et al., 2006; Rachidi et al., 2007). L'une d'entre elles, décrite par un groupe australien (Tani et al., 2000), est fondée sur l'expression plus forte dans les kératinocytes basaux d'une protéine membranaire liée à l'attachement cellulaire, l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$ , récepteur de la laminine 5. En utilisant en cytométrie de flux un double marquage combinant l'intégrine  $\alpha 6$  et le CD71, le récepteur à la transferrine, il est possible de séparer à partir d'une même préparation cellulaire les deux populations de la couche basale, les progéniteurs et les cellules souches. Cette technique fonctionne en routine au laboratoire d'Evry pour isoler les kératinocytes basaux du tissu cutané.

Pour les études de l'instabilité génomique, nous avons choisi d'utiliser un modèle original développé par le groupe d'Evry, les microcultures clonales (Fortunel et al., brevet 2008 ; Fortunel et al., 2009). Les kératinocytes fraîchement extraits de la peau sont triés de manière à isoler les kératinocytes progéniteurs. L'ensemencement de plaques à 96 puits est réalisé de manière automatique et contrôlée en cytométrie de flux. Les cellules sont cultivées pendant 15 jours, de manière à obtenir des lignées clonales de kératinocytes, issues d'une seule cellule. L'instabilité génomique peut ensuite être caractérisée à long-terme dans ce modèle.

Enfin, le groupe de Lyon a étudié des kératinocytes humains primaires, issus de biopsies de peau saine. Ces cellules peuvent être étudiées en phase de prolifération ou après une phase de différenciation.

## Méthodes

Radiobiologie :

- . toxicité précoce par le test XTT
- . survie clonogénique ou test des colonies
- . cassures simple brin de l'ADN par le test des comètes
- . cassures double brin de l'ADN par la technique des foci H2AX $\gamma$

Instabilité génomique :

- . cytogénétique
- . puces CGH

Génomique fonctionnelle :

- . puces à ADN
- . inactivation génique par interférence ARN stable après infection lentivirale
- . ChIP on chip

Protéomique fonctionnelle :

- . puces à activités de réparation de l'ADN

Nous avons utilisé les nouveaux outils de la biologie à grande échelle, qui permettent d'aborder les questions biologiques de manière globale. Ces nouveaux outils permettent d'étudier les objets biologiques comme des systèmes intégrés et de construire des réseaux dynamiques pour les interactions entre gènes et entre protéines. En génomique fonctionnelle, seuls deux groupes dont le nôtre ont abordé les effets des très faibles doses, et il n'existe aucune publication en protéomique fonctionnelle. De plus, ces approches n'ont jamais été utilisées pour caractériser la radiosensibilité de cellules souches épithéliales.

**Les puces d'activités de réparation** des lésions de l'ADN, développées par le laboratoire de Grenoble, constituent une des techniques originales utilisées dans le contrat BIRAD (Sauvaigo et al. 2004; Guerniou et al. 2005; brevets FR0101605 and FR0216435). Le principe consiste à mesurer *in vitro* des activités enzymatiques de réparation avec une

approche parallélisée, quantitative, miniaturisée et moyen-débit. Différentes préparations d'ADN plasmidique sont modifiées par des traitements physiques ou chimiques de façon à générer des lésions ou des familles de lésions ciblées et connues. Les plasmides sont ensuite purifiés sur gradient de sucrose de façon à ne conserver que les plasmides comportant les lésions. On obtient ainsi une dizaine de familles de lésions distinctes (dimères de pyrimidine de type cyclobutane, photoproduits (6-4), 8-oxoguanine, bases alkylées, adduits cisplatine, adduits psoralène, sites abasiques, ...), qui correspondent à des activités de réparation de type excision de base (BER) et excision de nucléotides (NER). Des gammes de dilution de ces différentes préparations sont déposées à l'aide d'un robot sur des lames de verre. Ces lames sont incubées en présence de l'extrait biologique d'intérêt. Le taux de réparation est mesuré suite à l'incorporation d'un ou plusieurs nucléosides triphosphates fluorescents en remplacement des lésions. Le signal obtenu pour chaque plasmide, au niveau de chacun des dépôts, est donc dépendant des activités de réparation présentes dans l'extrait et de la nature et la quantité des lésions reconnues. On obtient ainsi, pour chaque lysat cellulaire testé, une cartographie quantitative des activités enzymatiques fonctionnelles du lysat par rapport aux lésions présentes sur la puce.

**Pour la cytogénétique et les puces CGH**, les anomalies chromosomiques radio-induites ont été caractérisées dans le modèle d'étude clonal afin de pouvoir aborder les effets tardifs de l'exposition d'une cellule unique triée en cytométrie de flux. La descendance clonale des cellules irradiées a été étudiée jusqu'à 100 doublements de population.

### **III. Résultats**

#### **1) Radiosensibilité à 2 Gy**

Notre hypothèse de travail était que le réservoir à long terme de la régénération cutanée, constitué des cellules souches, devait être le mieux protégé des agents génotoxiques. Nous avons donc en premier exploré la réponse des kératinocytes à une dose de rayons  $\gamma$  de 2 Gy, la dose thérapeutique standard en radiothérapie. Des tests de toxicité cellulaire à court terme (XTT) et long terme (test de colonies) ont été effectués sur des populations primaires enrichies en cellules souches (intégrine  $\alpha 6+ / CD71-$ ) et en progéniteurs (intégrine  $\alpha 6+ / CD71+$ ). Ces tests ont montré que les progéniteurs sont radiosensibles, alors que les kératinocytes souches constituent une population plus radio-résistante (Rachidi et al., 2007).

#### **2) Réparation de l'ADN**

Pour comprendre les mécanismes de cette radiorésistance, nous avons étudié la réparation des lésions de l'ADN. Sans exposition à un stress, les activités de base de réparation des lésions de l'ADN de type BER et NER sont plus actives dans les cellules souches que dans les progéniteurs. Après irradiation gamma, la population souche possède des systèmes de réparation de l'ADN plus rapides et plus performants que la population progénitrice, aussi bien pour les cassures simple brin que pour les cassures double brin. De plus, des voies de signalisation cellulaire spécifiques sont activées, en particulier celle du FGF2. Nous montrons que cette voie de signalisation aurait un rôle direct d'activation de la réparation des cassures simple et double brin de l'ADN. En résumé, les cellules souches développent effectivement un ensemble de stratégies qui permettent une protection élevée contre les agents génotoxiques, alors que les progéniteurs sont à la fois plus sensibles et réparent moins bien les dommages (Harfouche, submitted). Ces résultats peuvent être analysés en termes de risque de cancérogenèse. Il a été proposé que les progéniteurs des kératinocytes soient à l'origine des carcinomes spino-cellulaires. Nos résultats sont en faveur de cette hypothèse, car les progéniteurs qui résisteraient à une exposition pourraient conserver des lésions de l'ADN mal réparées et initier un processus de cancérogenèse.

### **3) Effets à long terme : instabilité chromosomique**

Le dogme classique de la transmission des dommages radio-induits considère que soit la cellule a été correctement réparée et toutes les cellules issues de cette cellule seront « normales », soit la réparation a été fautive et toute la descendance de cette cellule portera la même anomalie radio-induite. Récemment il a été montré qu'un faible pourcentage de cellules irradiées échappait à ce dogme et qu'une instabilité pouvait se manifester au cours de la prolifération cellulaire.

Le modèle idéal pour tester l'apparition d'une telle instabilité est le suivi de populations cellulaires issues de cellules uniques. Une étude sur les kératinocytes progéniteurs a été réalisée, puisque les effets à court terme pointaient sur le risque encouru par cette population. Une cohorte comprenant 25 clones témoins et 20 clones irradiés a été étudiée. Les kératinocytes progéniteurs ont été exposés à une dose de 2 Gy, délivrée en culture primaire à l'état de cellule isolée. Les cellules résistantes ont donné naissance à une descendance qui a été caractérisée en cytogénétique à 30 doublements de population. Les populations issues de cellules irradiées présentent une instabilité importante. Parmi 6 clones irradiés, un seul clone présente une transmission classique des aberrations chromosomiques radioinduites et un autre clone présente une légère instabilité. Les 4 autres clones présentent une instabilité chromosomique très importante, conférant pour certaines cellules un avantage prolifératif tel que les cellules porteuses forment des sous-clones cellulaires (clones cytogénétiques, ie au moins 2 cellules porteuses des mêmes anomalies chromosomiques). L'évolution de l'instabilité chromosomique conduit à une grande accumulation de dommages chromosomiques variés. Dans un clone, ces anomalies chromosomiques sont caractérisées par une accumulation de translocations non réciproques suite à une délétion du chromosome 18 générant la perte d'un télomère et des cycles de cassures-fusions pouvant générer des amplifications géniques.

En conclusion, les kératinocytes progéniteurs qui ont résisté à une dose de 2 Gy, délivrée en culture primaire à l'état de cellule isolée, donnent naissance à une descendance qui se caractérise d'une part par la présence d'anomalies chromosomiques après 30 doublements de populations et d'autre part par une forte instabilité chromosomique. Ces résultats ont été complétés par une étude sur les clones de progéniteurs à passages plus tardifs (jusqu'à 100 doublements de population) utilisant des puces CGH. Tous les clones irradiés sont porteurs d'anomalies chromosomiques. Néanmoins, la majorité d'entre eux présente une sénescence répliquative. Une minorité de clones (15%) acquière un potentiel de croissance anormal, associé à des altérations dans des gènes clés de la transformation cellulaire, comme c-Myc et Rb.

Ces résultats pointent à nouveau sur le risque de radiocarcérogenèse au niveau de la population des kératinocytes progéniteurs, qui constituent 10% des kératinocytes de l'épiderme humain.

### **4) Kératinocytes progéniteurs et faible doses**

Ayant posé les bases de la radiosensibilité à une dose d'intérêt thérapeutique des deux populations de kératinocytes composant la couche basale de l'épiderme, nous avons pu ensuite aborder l'effet de faibles doses de rayonnement ionisant. Nous avons choisi de caractériser la réponse des kératinocytes progéniteurs à la dose de 10 mGy de rayons  $\gamma$ . En effet, il a été proposé que ces cellules soient à l'origine des carcinomes de type spinocellulaire, qui sont les carcinomes qui posent les plus graves problèmes thérapeutiques. Nous avons établi que ces progéniteurs constituent une population particulièrement radiosensible à court terme et capable de développer une instabilité chromosomique à long terme. La dose de 10 mGy est une très faible dose, du type de celles qui peuvent être reçues lors d'un diagnostic médical. Notre laboratoire a déjà démontré que cette dose provoque une réponse biologique dans les kératinocytes humains différenciés (Franco et al., 2005). Les analyses réalisées concernent la population cellulaire enrichie en cellules progénitrices sur le phénotype  $\alpha6^+/CD71^+$ . Dans le cadre de ces expériences, nous avons abordé la toxicité à court terme et à moyen terme ainsi que l'induction des cassures

double-brin de l'ADN détectées grâce à l'immunomarquage contre la forme phosphorylée de H2AX.

Nous montrons avec un test de colonies que la dose de 10 mGy induit une toxicité faible mais significative après 15 jours de culture dans les progéniteurs (8% de cellules mortes,  $n=5$ ,  $p<0.015$ ). Nous avons ensuite étudié l'induction de cassures double brin de l'ADN. La faible dose de 10 mGy induit dans 27% des cellules un nombre faible mais significatif de cdb (1 à 2 cdb par cellule), qui semblent complètement réparées à 24 heures car il n'y a plus de foci H2AXg détectables. Cette dose est donc suffisante pour induire les activités de réparation, contrairement aux modèles proposés par certains auteurs (Rothkamm et al., 2003). En résumé, la très faible dose de 10 mGy induit des lésions dans les kératinocytes progéniteurs qui pourraient induire les étapes précoces de la cancérogenèse si la réparation des cassures n'est pas fidèle ou bien si cette dose est suffisante pour induire une instabilité chromosomique à long terme.

### **5) Mécanismes de régulation de la réponse génique des kératinocytes à l'irradiation faible dose**

Au sein du projet BIRAD, le laboratoire de Lyon avait pour objectif de décrire les réseaux génétiques contrôlés par le facteur de transcription GATA3 dans les cellules épidermiques en réponse à une irradiation faible dose. En effet, par une approche génomique et bio-informatique, GATA3 avait été identifié comme étant un régulateur potentiel de la réponse transcriptomique à la faible dose dans les kératinocytes différenciés (Franco et al., Rad Res 2005). Nous avons d'abord confirmé que GATA3 se lie sur les promoteurs de certains gènes cibles après irradiation 1 cGy. Pour comprendre le rôle de GATA3, nous avons d'abord établi son patron d'expression dans la peau humaine et montré que cette protéine est exprimée dans les kératinocytes des couches suprabasales et dans les cellules différenciées en culture. Nous avons ensuite mis au point un modèle cellulaire de kératinocytes primaires humains différenciés dans lesquels l'expression de GATA3 est invalidée par ARN interférence stable après infection lentivirale (cellules shGATA3). L'étude de la viabilité 72h après irradiation a montré un excès de mortalité dans les cellules shGATA3 irradiées à 1 cGy alors qu'aucune différence significative n'est observée après une irradiation de 2 Gy. L'étude de la survie à long terme témoigne au contraire d'une capacité clonale supérieure des cellules shGATA3, révélatrice d'une activation de la prolifération après silencing de GATA3, mais pas d'effet majeur sur la radiosensibilité aux 2 doses.

Nous avons ensuite comparé la réponse transcriptomique des kératinocytes humains soumis à une dose de rayons X de 1 cGy dans un contexte génétique normal (shCTRL) et dans un contexte d'inactivation de GATA3 (shGATA3). Nous avons observé une dérégulation complète de la réponse transcriptomique dans les cellules shGATA3 48h après l'irradiation avec une augmentation très forte du nombre de gènes dont l'expression est modifiée. Parmi ces gènes, plusieurs répondent aux TGF $\beta$  et participent à la voie des MAPK, voies essentielles dans la réponse au stress génotoxique. Les gènes dérégulés à 48h dans le contexte shGATA3 sont-ils des cibles directes du facteur de transcription ? Pour répondre à cette question, nous avons mis en œuvre une recherche exhaustive des cibles de GATA3 dans les cellules irradiées par immunoprécipitation de chromatine couplée à une hybridation sur puce à ADN génomique (Approche CHIP on chip). L'analyse des résultats indique que les gènes dérégulés à 48h seraient des cibles indirectes de GATA3.

En résumé, nous avons montré que **l'inactivation de GATA3 modifie fortement le profil de réponse génique à l'irradiation faible dose** (Bonin et al., 2009). GATA3 semble jouer un rôle complexe dans la réponse cellulaire à l'irradiation, en régulant de façon directe et indirecte des voies moléculaires essentielles à l'homéostasie cellulaire. Ce facteur de transcription est le premier dont on parvient à montrer le rôle spécifique dans la réponse à l'irradiation 1 cGy. En complément, notre étude transcriptomique permet d'identifier **de nouveaux biomarqueurs moléculaires** de la réponse à l'irradiation X faible dose dans les kératinocytes humains.

#### IV. Discussion

Le projet BIRAD avait pour but d'aborder les étapes précoces de la cancérogenèse radio-induite dans les kératinocytes souches et progéniteurs humains. Nous avons caractérisé dans un premier temps les effets de la dose standard d'intérêt thérapeutique (2 Gy). Nous montrons que :

- les cellules souches sont radiorésistantes
- elles possèdent de base un métabolisme activé de réparation des lésions de l'ADN de type BER et NER
- elles réparent rapidement les cassures simple et double brin de l'ADN radio-induits
- La réparation de ces cassures est complète à 24 heures
- Les CS activent des voies de signalisation spécifiques après irradiation, notamment celle du FGF2
- Nous démontrons pour la première fois un lien entre le FGF2 et la réparation des cdb de l'ADN. Le FGF2 endogène synthétisé par les CS protège leur génome.

Les cellules souches développent donc un ensemble de mécanismes qui les protègent des agents génotoxiques. Cette résistance s'étend aux toxiques en général, puisqu'elle est par exemple à la base de méthodes permettant d'isoler des cellules souches (Larderet et al., 2006). Malgré cela, le risque cancérogène existe, car ce sont les seules cellules de l'épiderme humain qui peuvent demeurer dans l'épiderme pendant toute la vie d'un individu, et donc accumuler des dommages. Il faut donc développer des études concernant les effets tardifs d'une irradiation. Concernant les kératinocytes progéniteurs, nous montrons que :

- les progéniteurs sont radiosensibles
- ils possèdent de base un métabolisme peu activé de réparation des lésions de l'ADN de type BER et NER
- ils réparent lentement les cassures simple et double brin de l'ADN radio-induits et de manière incomplète
- une irradiation à 2 Gy induit une instabilité chromosomique à long terme dans les progéniteurs
- le FGF2 exogène active la réparation de l'ADN dans les kératinocytes progéniteurs

Ces résultats montrent que cette population importante en nombre, 10% des kératinocytes, peut constituer une cible majeure de la cancérogenèse. Ils sont en faveur des théories qui proposent que ces kératinocytes soient à l'origine des carcinomes spino-cellulaires.

Par ailleurs, les résultats obtenus concernant le FGF2 ont un grand intérêt. En effet, il a été démontré dans plusieurs modèles que ce facteur protège de la mort cellulaire radio-induite, en culture comme *in vivo*. Le risque peut être alors de favoriser la survie de cellules ayant acquis une lésion de l'ADN. Comme nous montrons que le FGF2 active la réparation de l'ADN dans les cellules souches et dans les progéniteurs, cette double action permet de proposer ce facteur comme une nouvelle piste de traitement de la peau comme radioprotecteur, par exemple pendant une radiothérapie. En effet, 95% des patients de radiothérapie développent des réactions cutanées, qui peuvent être précoces, de type brûlure, ou tardives (Trotti et al., 2000; Barnett et al., 2009). Les séquelles tardives peuvent être des hyperplasies bénignes, de type fibrose et kératose (Martin et al., 2000 ; Sivan et al., 2002) ou des carcinomes. L'application locale du FG2, à distance de la tumeur, pourrait réduire ces complications cutanées sans interférer avec le contrôle tumoral.

Ayant posé les bases de la radiosensibilité à une dose thérapeutique, nous avons abordé les effets des faibles doses en choisissant d'étudier les kératinocytes progéniteurs. Nous montrons que la faible dose de 10 mGy, qui peut être reçue lors d'un examen de diagnostic ou d'une imagerie interventionnelle, provoque une toxicité faible mais significative dans les progéniteurs. Cette dose provoque clairement des cassures double brin de l'ADN, la lésion potentiellement la plus dangereuse induite par les rayonnements ionisants. Par contre, il semble que les systèmes de réparation fonctionnent normalement sur un délai de 24 heures. Donc le seuil d'induction de la réparation, s'il existe, est inférieur à cette dose dans les kératinocytes progéniteurs. Il semble majeur d'aborder maintenant les effets à long terme d'une telle exposition. Ceci sera fait dans le cadre du contrat ANR LODORA, qui donne un

cadre à la suite de ces expériences. Ces études seront développées dans le modèle de culture clonale, dans lequel un kératinocyte progéniteur ou souche est irradié à l'état de cellule unique, le lendemain de son isolement de l'épiderme. Dans ce modèle original, la descendance étant homogène, il est possible de mettre précisément en évidence des événements précoces de processus de cancérogenèse, comme l'apparition d'anomalies chromosomiques ou de mutations, ainsi que leurs éventuels avantages prolifératifs. Cette descendance peut ensuite être testée en reconstitution épidermique et par injection dans une souris immunodéficiente. Comme toute étude concernant les faibles doses, la difficulté consistera à pouvoir étudier un nombre suffisant de cellules pour pouvoir mettre en évidence des événements rares.

**En conclusion, le projet BIRAD a atteint son but qui était de d'aborder le rôle des kératinocytes souches et progéniteurs humains dans la cancérogenèse radio-induite. Il ouvre de nombreuses perspectives de recherche ainsi que des perspectives d'applications médicales, industrielles et de radioprotection. La perspective médicale est liée à une possible application du FG2 dans la protection cutanée pendant la radiothérapie. La perspective industrielle est liée aux développements en dermatologie et cosmétologie autour du brevet concernant les microcultures clonales de kératinocytes. Enfin, les perspectives en radioprotection sont liées au progrès dans la connaissance des effets des rayonnements ionisants sur les kératinocytes souches et progéniteurs, qui pourraient conduire à faire évoluer les normes concernant ce tissu, et à l'utilisation potentielle de biomarqueurs d'exposition à l'irradiation faible dose..**

Le contrat ANR BIRAD s'est terminé en décembre 2008. Les partenaires ont souhaité poursuivre ensemble leurs recherches sur les effets des faibles doses. Ils ont présenté un projet à l'ANR en 2008, programme CES, qui a été sélectionné. Ce nouveau projet, appelé LODORA, a pour titre : « Réponses de la peau humaine aux rayonnements ionisants de faibles doses : estimation du risque et établissement des nouveaux biomarqueurs. » Ce nouveau réseau comprend les anciens partenaires, Evry, Lyon et Grenoble, auxquels s'ajoute un nouveau partenaire, Odile Damour, du Laboratoire « Banque de tissus et cellules », Hospices Civils de Lyon.

## References

- . Azzam, E.I., S.M. de Toledo, and J.B. Little, Expression of CONNEXIN43 is highly sensitive to ionizing radiation and other environmental stresses. *Cancer Res*, 2003. 63(21): p. 7128-35.
- . Barnett GC, West CM, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PD, Burnet NG. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer*. 2009 Feb;9(2):134-42.
- . Delanian S & Lefaix JL (2007) Current management for late normal tissue injury: radiation-induced fibrosis and necrosis. *Semin Radiat Oncol* 17(2):99-107.
- . Fortunel NO, Otu H, Ng HH, Chen J, Mu X, Chevassut T, Li X, Joseph M, Bailey C, Hatzfeld JA, Hatzfeld A, Usta F, Vega VB, Long PM, Libermann TA & B Lim (2003). Comment on " 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "A stem cell molecular signature". *Science*. 302: 393.
- . Franco, N., et al., Low-Dose Exposure to gamma Rays Induces Specific Gene Regulations in Normal Human Keratinocytes. *Radiat Res*, 2005. 163(6): p. 623-35.
- . G Larderet, N O Fortunel, P Vaigot, M Cegalerba, P Maltère, O Zobiri, X Gidrol, G Waksman, M T Martin. Human SP keratinocytes exhibit long-term proliferative potential, a specific gene expression profile, and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells*, 2006, 24: 965-974..
- . Martin M, Lefaix J, & Delanian S (2000) TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47(2):277-290.
- . Morris, R.J., A perspective on keratinocyte stem cells as targets for skin carcinogenesis. *Differentiation*, 2004. 72(8): p. 381-6.
- . Murnane JP, Sabatier L. Chromosome rearrangements resulting from telomere dysfunction and their role in cancer. *Bioessays*. 2004 Nov;26(11):1164-74. Review.
- . Rothkamm, K. and M. Lobrich, Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(9): p. 5057-62
- . Sabatier L, Ricoul M, Pottier G, Murnane JP. The loss of a single telomere can result in instability of multiple chromosomes in a human tumor cell line *Mol Cancer Res*. 2005 Mar;3(3):139-50
- . Sauvaigo, S., et al., An oligonucleotide microarray for the monitoring of repair enzyme activity toward different DNA base damage. *Anal Biochem*, 2004. 333(1): p. 182-92.
- . S. Sell. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 51 (2004) 1–28.
- . Shore, R.E., Radiation-induced skin cancer in humans. *Med Pediatr Oncol*, 2001. 36(5): p. 549-54.
- . Sivan V, Vozenin-Brotans M-C, Tricaud Y, Lefaix J-L, Cosset J-M, Martin M. Altered proliferation and differentiation of human epidermis in cases of skin fibrosis after radiotherapy. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, 2002, 53, 2: 385-393.
- . Tani, H., R.J. Morris, and P. Kaur, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97: p. 10960-10965.

- . Tubiana, M., et al., La relation dose-effet et l'estimation des effets cancérigènes des faibles doses de rayonnements ionisants, in *Compte-rendus de l'Académie Nationale de Médecine*. 2005
- . Trotti A (2000) Toxicity in head and neck cancer: a review of trends and issues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47(1):1-12.

### **Publications liées au projet**

- Rachidi W, Harfouche G, Lemaitre G, Amiot F, Vaigot P, Martin MT. Sensing radiosensitivity of human epidermal stem cells. **Radiotherapy and Oncology**, 2007, 83, 267-276.
- Martin MT. Rôle et propriétés des cellules souches de l'épiderme humain. **Revue générale de droit médical**, 2007, n°24, 23-28. Editeur: Les études hospitalières.
- Fortunel NO and MT. Martin. Cellules souches de l'épiderme interfolliculaire humain : phénotypes et potentialités. **J Soc Biol**, 2008, 202: 55-65.
- Martin MT. La Lettre – Nucléaire et Santé Actualités, EDF, 2008. Cellules souches de l'épiderme humain : définir enfin la vraie cible cellulaire des rayonnements ionisants ?
- Bonin F, Molina M, Malet C, Ginestet C, Berthier-Vergnes O, Martin MT and Lamartine J. GATA3 is a master regulator of the transcriptional response to low-dose ionizing radiation in human keratinocytes. **BMC Genomics**, 2009, BMC Genomics. 2009 Sep 7;10:417.
- Fortunel NO, Vaigot P, Cadio E, and Martin MT. Functional investigations of keratinocyte stem cells and progenitors at a single-cell level using multiparallel clonal microcultures. **Methods in Molecular Biology**, 2009. Epidermal Cells Methods and Protocols, Humana Press, edited by K Turksen, in press.
- Harfouche G and Martin MT. Radiosensitivity of stem cells in normal tissues: a balance between tissue homeostasis and genomic stability. **Mutation Research Review**, 2009, in press.

### **Brevets**

- Fortunel N, Vaigot P et Martin M. Dépôt de demande de brevet français n° FR 08 51054, 28 mars 2008. Système et procédé de culture clonale de cellules épithéliales et leurs applications.
- Fortunel N, Vaigot P et Martin M. Dépôt de demande de brevet européen n°FR20080051054 20080219, 21 08 2009. Système et procédé de culture clonale de cellules épithéliales et leurs applications.

### **Submitted articles**

- Fortunel NO, Cadio E, Vaigot P, Chadli L, Moratille S, Bouet S, Roméo PH and Martin MT. Parallel clonal microcultures of keratinocytes: a new experimental system to explore the functional hierarchy of the basal layer of human epidermis. In revision for *Experimental Dermatology*.
- Harfouche G, Rachidi W, Vaigot P, Salah-Mohellibi N, Moratille S, Lemaitre G, Fortunel NO and Martin MT. FGF2 signaling is critical for DNA repair in human keratinocyte stem cells. Submitted to *Stem Cells*.