

Impact des polluants persistants sur la différenciation des cellules souches embryonnaires et intestinales adultes

Benoit MIOTTO et Nadège GUINOT | benoit.miotto@inserm.fr

Inserm U1016, CNRS UMR8104, Univ. Paris Descartes - Institut Cochin - Paris

Mots clés : Cellules souches, différenciation cellulaire, épigénétique, pluripotence, polluants persistants

L'exposition aux polluants de l'environnement est un problème majeur de santé publique. De nombreuses molécules font ainsi l'objet de surveillance par les organismes de santé du fait de conséquences, supposées ou avérées, sur l'organisme. La dioxine présente dans la fumée de cigarette ou des gaz d'échappements des véhicules, est classée comme substance cancérigène par l'organisation mondiale de la santé. De nombreuses publications ont mis en avant les conséquences de l'exposition à la dioxine sur la santé humaine, et la différenciation cellulaire, notamment des cellules souches (1-3). La propagation, le renouvellement et la différenciation des cellules souches est très finement régulé. Les cellules souches, contrairement aux autres cellules de l'organisme, ont la capacité de se renouveler 'virtuellement' à l'infini, et de pouvoir se différencier, dans un environnement approprié, en tout type cellulaire.

Les deux articles sélectionnés dans cette note étudient l'effet de l'activation du récepteur aux hydrocarbures aromatiques AHR* sur la capacité de différenciation de cellules souches embryonnaires *in vitro*, et sur les cellules souches de l'épithélium intestinal chez la souris adulte. Dans ces deux cas (*in vivo* et *in vitro*), la modulation de l'activité d'AHR conduit à une altération de la différenciation des cellules. Le rôle régulateur de la dioxine serait dû à une altération de l'expression de certains gènes associés au caractère 'souche'.

Ces deux études mettent donc une nouvelle fois en avant l'effet toxique de la dioxine, et propose un rôle direct de cette dernière, via son récepteur AHR, sur la fonction des cellules souches embryonnaires et intestinales adultes.

Le récepteur aux xénobiotiques AHR contrôle la différenciation des cellules souches embryonnaires humaines en liant une séquence répétée de type Alu

Morales-Hernandez A. et al. (2016). Alu retrotransposons promote differentiation of human carcinoma cells through the aryl hydrocarbon receptor. *Nucleic Acids Res*, vol. 44: p.4665-83.

Résumé

Les séquences Alu* sont très abondantes dans le génome humain (10 % de la taille du génome) et pourraient être impliquées dans le contrôle de l'expression génique en créant des sites de liaison pour facteurs de transcription (4). L'équipe dirigée par Dr Fernandez-Salguero démontre, dans deux types de cellules souches embryonnaires humaines (H9 et NTERA), que le récepteur AHR* contrôle la différenciation cellulaire en se liant à une de ces séquences Alu présente en amont du promoteur du gène de pluripotence NANOG.

Les auteurs montrent que lors de la différenciation des cellules souches induite en présence d'acide rétinoïque, l'expression d'AHR augmente et que la protéine s'accumule dans le noyau. L'inactivation d'AHR par interférence à l'ARN perturbe la différenciation. Ainsi, à l'inverse des cellules contrôles, les cellules inactivées pour AHR restent bloquées à un stade précoce de différenciation, avec une expression élevée des marqueurs de pluripotence OCT4 et NANOG. Ces données démontrent la fonction essentielle d'AHR dans la

différenciation des cellules souches, et confirment les données d'autres laboratoires.

Les auteurs ont ensuite analysé de manière plus précise la séquence ADN des régions promotrices des gènes NANOG et OCT4. Ils ont ainsi identifié des séquences Alu contenant un motif de liaison à AHR, prédit *in silico*, en amont des promoteurs des deux gènes. Ils ont par la suite confirmé la liaison d'AHR à ces motifs *in vivo* par une expérience d'immuno-précipitation de la chromatine au cours de la différenciation.

Une étude complémentaire démontre que des ARN non-codants sont produits à partir de ces séquences Alu, appelés respectivement NANOG-Alu et OCT4-Alu, et que leur expression augmente au cours de la différenciation. L'inactivation d'AHR inhibe l'expression de NANOG-Alu et OCT4-Alu au cours de la différenciation, indiquant que ces deux ARN jouent un rôle déterminant dans la différenciation. Les auteurs ont alors exprimé ces ARN dans les cellules et observé que l'expression de NANOG-Alu est suffisante pour inhiber l'expression aussi bien d'OCT4 que de NANOG, sans toutefois affecter l'expression d'autres gènes de pluripotence. Ils en concluent que la liaison d'AHR à la séquence NANOG-Alu, conduirait à la production d'un ARN non-codant au cours de la différenciation qui serait nécessaire à l'extinction de l'expression des gènes NANOG et OCT4. Pour valider cette interprétation, les auteurs finissent par démontrer que l'ARN produit à partir NANOG-Alu est pris en charge par la machinerie de l'interférence à l'ARN, et qu'il contient des séquences d'ADN complémentaires des régions 3'-UTR des ARN messagers de NANOG et OCT4. Cet ARN non-codant produit en amont du promoteur de NANOG est donc bien nécessaire à l'extinction de NANOG et OCT4.

L'ensemble indique que le récepteur AHR affecte la différenciation des cellules souches en modulant l'expression d'un ARN non-codant produit à partir d'une séquence répétée du génome.

Commentaire

Les auteurs montrent de manière élégante, que l'activation du récepteur AHR au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires, régule l'expression de certains gènes clés de la pluripotence, NANOG et OCT4. De manière surprenante, cette régulation est indirecte. AHR se lie au niveau d'une séquence répétée du génome appelée Alu (situé en amont du promoteur du gène NANOG) pour induire la production d'un ARN non-codant, qui en retour interfère avec la production des ARN messagers de NANOG et OCT4. Ce travail décrit une nouvelle fonction du récepteur AHR sur la 'face cachée' du génome : les séquences répétées. De nombreuses analyses de transcriptomes de cellules exposées à une variété de polluants ont été réalisées ces dernières années. Au vu de l'abondance des séquences répétées dans le génome humain, ce travail suggère qu'une ré-analyse de ces données pourrait identifier de nouvelles cibles transcriptionnelles et de nouveaux modes d'action de certains polluants. Il s'agit donc d'une étude importante qui mérite d'être complétée par des analyses en systèmes plus complexes, tel l'animal ou l'humain, et étendue à d'autres types cellulaires. La dérégulation de l'expression de gènes non-codants pourrait être une marque précoce des conséquences de l'exposition à certains polluants de l'environnement sur l'organisme, et à l'origine de la susceptibilité accrue à certaines maladies, comme le cancer.

L'activation de AhR par ses ligands (la 6-formylindolo[3,2-b]carbazole et la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine) bloque la différenciation de l'épithélium intestinal

Park JH. et al. (2016). AhR activation by 6-formylindolo [3,2-b]carbazole and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibit the development of mouse intestinal epithelial cells. *Environ Toxicol Pharmacol*, vol. 43: p. 44-53.

Résumé

Les cellules épithéliales de l'intestin jouent un rôle de barrière entre l'organisme et l'environnement extérieur. Ces cellules proviennent de la différenciation de cellules souches localisées dans la crypte des repliements de l'épithélium intestinal (5). L'équipe de Dr. Jeong montre que l'exposition de souris à deux ligands d'AhR, la 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ^{*}) et la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD^{*}), bloque la différenciation de l'épithélium intestinal, en activant la signalisation médiée par AhR.

Dans une première expérience, les auteurs montrent que le récepteur AhR est fortement exprimé dans les cellules souches de la crypte, identifié par l'expression du marqueur Lgr5. Ce marqueur permet ensuite aux auteurs d'isoler les cellules souches de l'épithélium (Lgr5 positive), de les maintenir en culture *in vitro* et d'induire la formation d'organoïdes en sept jours. La formation de ces organoïdes récapitule en partie le développement de l'épithélium

intestinal. L'ajout de FICZ ou de TCDD bloque la formation des organoïdes, le FICZ ayant un effet délétère plus important que le TCDD, à des concentrations similaires. Les auteurs testent alors l'effet du FICZ sur l'intestin de souris adulte, en l'administrant par gavage. Après 10 jours, les souris sont sacrifiées et une analyse cytologique des cryptes de l'intestin et du colon est réalisée. Au niveau de l'intestin, le nombre de cryptes est diminué chez les souris exposées à FICZ (12,5 +/-1,5) par rapport aux souris non gavées (15,2 +/-1,3). La profondeur des cryptes est aussi réduite (85 +/-5µM) comparée aux souris contrôles (103,9 +/-9 µM). Au niveau du colon, la profondeur des cryptes est aussi significativement réduite chez les souris exposées au FICZ. L'ensemble des données démontre que l'exposition au FICZ bloque la différenciation des cellules souches de l'intestin, *in vitro* et *in vivo*.

Les auteurs confirment l'effet délétère de FICZ sur la différenciation en démontrant une altération de l'expression de certains gènes de la différenciation, aussi bien dans les organoïdes que dans l'intestin adulte de souris.

Commentaire

Les résultats obtenus confirment ce qui a été précédemment observés pour d'autres types de cellules souches, que l'activation de la signalisation AhR par ses ligands bloque la différenciation cellulaire. Ces résultats sont toutefois très importants puisqu'ils démontrent de manière exhaustive les conséquences de l'exposition au FICZ (6-formylindolo[3,2-b]carbazole) sur la différenciation de l'épithélium intestinal adulte et la différenciation des cellules 'souches' Lgr5 *in vitro*. Ce résultat pourrait apporter de nouvelles pistes de réflexion pour expliquer des données antérieures montrant un lien entre FICZ et l'inflammation du colon chez l'homme (6). En perturbant le renouvellement des cellules de la paroi de l'intestin et du colon, FICZ pourrait perturber l'équilibre de la flore bactérienne ou encore les défenses immunitaires de l'organisme, conduisant à une inflammation chronique propice à l'émergence de cancer.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les deux études apportent des arguments supplémentaires suggérant un effet néfaste de la dioxine, et des ligands d'AHR, sur la capacité de différenciation des cellules souches embryonnaires et adultes. Les deux études offrent un nouveau regard sur la signalisation AHR dans le contrôle de l'expression des gènes, en particulier des ARN non-codants. Ces études invitent d'ailleurs à une réévaluation de données antérieures. D'une part, l'effet des ligands d'AHR sur l'expression des séquences répétées du génome pourrait offrir de nouvelles perspectives pour évaluer les conséquences biologiques de l'environnement sur l'organisme, pour expliquer la susceptibilité au cancer ou, au contraire, pour contraindre la fonction des cellules souches cancéreuses. D'autre part, l'activation d'AHR en bloquant le renouvellement de cellules endommagées (comme montré pour l'intestin) pourrait engendrer l'apparition d'un micro-environnement, pro-inflammatoire, permettant l'émergence de cancer.

GENERAL CONCLUSION

Two additional studies indicate that activation of the aryl hydrocarbon receptor (AHR), by its ligands, inhibits the differentiation of stem cells. Activation of AHR activity in human embryonic stem cells and in murine stem cells from the adult intestinal crypt alter the proper extinction of 'stemness' transcription factors during differentiation. These new findings prompt re-evaluation of previous transcriptomic analysis of cells exposed to various pollutants. On the one hand, non-coding RNA produced from repeated DNA repeats might offer new avenues to detect and to evaluate the deleterious effects of pollutants from the environment on tissues and organisms, and some might be markers of the emergence of cancer. On the other hand, by blocking the capacity of stem cells to replace damaged cells, AHR signaling activation, might promote a micro-environment that could favor the emergence of cancer.

Lexique

AHR : facteur de transcription, communément appelé récepteur aux hydrocarbures aromatiques, qui est activé par différents types de xénobiotiques. On l'écrit AHR pour l'humain ; AhR chez la souris

ARN non codant : ARN non traduit en protéine par les ribosomes.

Cellule souche : cellule indifférenciée, se maintenant indéfiniment en culture, et pouvant se différencier en cellule spécialisée. Les cellules souches totipotentes peuvent générer tout type cellulaire, alors que les cellules souches pluripotentes peuvent donner tous les types cellulaires à l'exception des annexes embryonnaires. On en trouve au

stade précoce du développement (cellule souche embryonnaire) et dans les tissus adultes, où elle joue un rôle de maintien de l'intégrité tissulaire.

Crypte intestinale: localisée entre deux villosités de l'intestin, elle est constituée de plusieurs types cellulaires, les cellules souches étant localisées à l'extrémité la plus éloignée de la lumière de l'intestin. Ces cellules souches permettent le remplacement au cours de la vie adulte des cellules intestinales détruites.

Dioxine : la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine ou TCDD appartient à la famille des polychlorodibenzo-p-dioxines. C'est la molécule la plus toxique de la famille pour l'Homme et classée comme molécule cancérigène.

FICZ : FICZ (ou 6-Formylindolo(3,2-b)carbazole) : agoniste du récepteur AHR. Il s'agit du composé connu ayant la plus forte affinité pour le récepteur AHR.

Gènes ou facteurs de pluripotence : Il s'agit de l'ensemble des gènes nécessaires et suffisants pour permettre à une cellule de se renouveler à l'infini en culture et de se différencier en tous les types cellulaires. Un prix Nobel, attribué conjointement au Dr Gurdon et Dr Yamanaka, a popularisé certains de ces gènes : Nanog, Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc.

Séquence Alu : les SINE (short interspersed nuclear elements) sont des petites séquences d'ADN (environ 300bp) ayant envahi au cours de l'évolution les génomes de mammifères. Les séquences Alu représentent la majorité de ces éléments SINE. Il en existe plus d'un million de copies dans le génome humain. Leur fonction reste énigmatique même si plusieurs études suggèrent une implication dans le contrôle de l'expression des gènes ou l'organisation fonctionnelle du génome

Publications de référence

1 Wang Y, Fan Y, Puga A. Dioxin exposure disrupts the differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Toxicol Sci.* 2010 ; 115 (1):225-37.

2 Neri T, Merico V, Fiordaliso F, et al. The differentiation of cardiomyocytes from mouse embryonic stem cells is altered by dioxin. *Toxicol Lett.* 2011 ; 202 (3):226-36.

3 Ahrenhoerster LS, Tate ER, Lakatos PA, et al. Developmental exposure to 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin attenuates capacity of hematopoietic stem cells to undergo lymphocyte differentiation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014 ; 277 (2):172-82.

4 Pandey R, Mukerji M. From 'JUNK' to just unexplored noncoding knowledge: the case of transcribed Alus. *Brief Funct Genomics.* 2011 ; 10 (5):294-311.

5 Henning SJ, von Furstenberg RJ. GI stem cells - new insights into roles in physiology and pathophysiology. *J Physiol.* 2016 [Epub ahead of print]

6 Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, et al. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 2011 ; 141(1):237-48

Revue de la littérature

Wang Q, Kurita H, Carreira V, et al. Ah Receptor activation by dioxin disrupts Activin, BMP, and WNT signals during the

early differentiation of mouse embryonic stem cells and inhibits cardiomyocyte functions. *Toxicol Sci.* 2016 149(2):346-57.

Kim HM, Kim JW, Choi Y, et al. Xeno-sensing activity of the aryl hydrocarbon receptor in human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Sci Rep.* 2016 ; 6:21684.

Jönsson ME, Mattsson A, Shaik S, et al. Toxicity and cytochrome P450 1A mRNA induction by 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) in chicken and Japanese quail embryos. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2016 ; 179:125-36.

Stanford EA, Wang Z, Novikov O, et al. The role of the aryl hydrocarbon receptor in the development of cells with the molecular and functional characteristics of cancer stem-like cells. *BMC Biol.* 2016 ; 14:20.

Autres publications identifiées

Rentas S, Holzapfel NT, Belew MS, et al. Musashi-2 attenuates AHR signalling to expand human haematopoietic stem cells. *Nature.* 2016 ; 532(7600):508-11.

L'étude démontre le rôle du récepteur AHR dans le contrôle du caractère souche des cellules dérivées du sang de cordon ombilical. L'étude propose que la manipulation de l'activité de AHR pourrait permettre des gains de production de ces cellules souches et d'augmenter leur potentiel régénératif.

Mohammadi-Bardbori A, Akbarizadeh AR, Delju F, et al. Chromatin remodeling by curcumin alters endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling. *Chem Biol Interact.* 2016 ; 252:19-27.

L'étude montre dans des lignées de cellules dérivées de tumeurs de patient que l'activité d'AHR et l'expression de sa cible CYP1A1 induite par le FICZ in vitro est fortement modulé par le co-traitement avec la curcumine, un composé naturel. De manière surprenante l'effet biologique de la curcumine n'est pas linéaire en fonction de sa concentration. A faible concentration la curcumine augmente l'expression de CYP1A1 induite par FICZ, alors qu'à fortes concentrations la curcumine bloque l'induction de CYP1A1.

Brantley E, Callero MA, Berardi DE, et al. AhR ligand Amino-flavone inhibits α 6-integrin expression and breast cancer sphere-initiating capacity. *Cancer Lett.* 2016 ; 376(1):53-61.

L'étude montre que l'activation de la signalisation AHR, par l'aminoflavone et son dérivé AFP464, dans des cellules de cancer du sein bloque leur capacité à former des 'sphères' in vitro. Cela démontre le pouvoir anti-cancéreux de ces deux molécules, et leur capacité à bloquer, du moins in vitro, la propagation des cellules 'souches' cancéreuses.

Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt