

Pluripotentialité des kératinocytes et cellules souches épidermiques

The pluripotency of keratinocytes and epidermal stem cells

par Corinne Ferraris

Sciences du Vivant, L'Oréal Recherche, 90 Rue du Général Roguet, 92583 Clichy Cedex, France

Reçu le 29 octobre 2002

Chez les vertébrés les épithéliums pluristratifiés comme l'épithélium cornéen et l'épiderme proviennent d'une même origine embryonnaire, l'ectoderme. Ces tissus se renouvellent continuellement à partir de cellules souches. Ces dernières se caractérisent par une capacité d'auto-renouvellement supérieure à la durée de vie de l'individu. Elles sont pluripotentes et donnent naissance à des cellules dites cellules transitionnelles dont la capacité de prolifération est limitée dans le temps (Barrandon *et al.*, 1987; Barrandon, 1993). Après quelques divisions les cellules transitionnelles s'engagent irréversiblement dans une voie de différenciation de type cornéen ou épidermique en exprimant des marqueurs de différenciation spécifiques. La différenciation de type cornéen est caractérisée par la paire de kératine K3 et K12 alors que la différenciation de type épidermique est caractérisée par les kératines K1-2 et K10.

A ce jour différentes protéines ont été décrites comme étant potentiellement des marqueurs de cellules souches. Cependant l'ensemble des marqueurs classiquement employés caractérise des cellules transitionnelles à fort pouvoir de prolifération et ne sont donc pas spécifiques des cellules souches épidermiques. Parmi ces marqueurs se trouvent : (1) une forte expression de l'intégrine $\beta 1$ (Jones *et al.*, 1995), (2) une forte expression de l'intégrine $\alpha 6$ associée à une faible expression du récepteur de la transferrine (CD71), (3) la kératine 19 (Commo *et al.*, 2000), et (4) le produit du gène p63, un membre de la famille de gène p53 (Parsa *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999).

Nous avons développé une méthode permettant de sélectionner une sous-population enrichie en cellules souches épidermiques en nous basant sur des travaux réalisés sur les cellules souches hématopoïétiques (N. Fortunel *et al.*, 2000). Sachant que les cellules souches hématopoïétiques sont quiescentes et expriment faiblement des récepteurs aux facteurs de croissance à leur surface, nous avons sélectionné une sous-population de kératinocytes présentant ces caractéristiques. Les kératinocytes ont été isolés sur la base d'une faible expression à la surface de la cellule du récepteur à l'EGF (EGF-R^{low}). Le potentiel d'expansion long terme des différentes sous-populations a été évalué ainsi que leur capacité à reconstruire un épiderme *in vitro*. Les résultats démon-

trant que la sous-population, qui exprime le plus faiblement le récepteur à l'EGF, est enrichie en cellules souches. Ainsi une cellule présentant le phénotype EGF-R^{low} est capable d'une part de générer de 10^{16} à 10^{17} cellules en culture monocouche et, d'autre part de reformer un épiderme reconstruit parfaitement différencié *in vitro*.

Nous avons également évalué la capacité d'une cellule déjà engagée dans un type de différenciation épithéliale à être reprogrammée dans un autre type de différenciation tissulaire (Ferraris *et al.*, 1997, 2000). L'épithélium cornéen est un système de choix pour répondre à cette problématique car les cellules souches sont ségréguées des cellules différenciées dans une région particulière nommée le limbe. La cornée centrale qui ne contient que des cellules transitionnelles exprimant les kératines K3/K12 a été isolée et associée à un derme trichogène inducteur de follicules pileux. Après greffe sur la souris nude, les résultats montrent que l'épithélium cornéen génère, sous l'influence du derme, un épiderme parfaitement différencié auquel sont associés des ensembles pilosébacés. Nous avons pu conclure que les cellules de la cornée centrale bien que déjà différenciées pouvaient être reprogrammées dans une voie de différenciation de type épidermique.

En conclusion, ces travaux montrent que la compréhension des mécanismes d'action qui régulent la division des cellules souches et des cellules transitionnelles permettra de développer de nouveaux outils pour la recherche médicale et/ou l'évaluation de futurs produits pharmaceutiques.

Pluristratified epithelia of vertebrate skin and cornea, which share a common ectodermal embryonic origin, continuously regenerate from stem cells. Both of these tissues contain two types of proliferating keratinocytes : pluripotent stem cells with a long term capacity of self-renewal and transit-amplifying cells which are generally considered to be irreversibly committed to terminal differentiation after a few rounds of divisions (Barrandon *et al.*, 1987; Barrandon, 1993). As in other tissues, molecular markers characteristic of the epidermal stem cell population are lacking. A number of proteins have been reported to be markers for the stem cell compartment but, in retrospect, appear to be specific for the early transit-

amplifying cell population. Some markers to be described are the following ones : (1) elevated expression of $\beta 1$ integrin, receptors that bind extracellular matrix proteins (Jones *et al.*, 1995) (2) elevated expression of $\alpha 6$ integrin associated to low expression of CD71 (Li *et al.*, 1998) (3) the keratin 19 (Commo *et al.*, 2000) and (4) p63, a member of the p53 gene family (Parsa *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). The present study describes the isolation and partial characterization of a stem cell enriched human epidermal keratinocyte fraction. The fractionation was based on the criteria of a low growth factor receptor expression on the cell surface, characteristic for other stem cells types notably the hematopoietic stem cells (Fortunel *et al.*, 2000). The isolation criterion was a low expression of the epidermal growth factor receptor (EGF-R^{low}). In culture conditions without feeder accessory cells, a single EGF-R^{low} cell can give rise to 10^{16} - 10^{17} cells. Furthermore the EGF-R^{low} keratinocyte fraction was able to generate a fully differentiated reconstructed epidermis.

In correlation with the above work, we investigated whether transit-amplifying cells already committed to one cell lineage can activate different genetic programs in response to their environment (Ferraris *et al.*, 1997, 2000). In the corneal epithelium, stem and transit-amplifying cells are segregated into 2 separated localities--stem cells in the limbus and transit-amplifying cells in the center of the epithelium--and thus can be dissected from each other. Central adult corneal epithelium was placed on a hair-inducing embryonic dermis before grafting onto nude mice. Based on the knowledge that differentiated corneal keratinocytes express corneal-type keratin K3 and K12, whereas epidermal keratinocytes express keratin K1-2/K10, we were able to conclude that the basal cells from central cornea gave rise to a fully differentiated epidermis with pilosebaceous units. Secondly, when the central adult corneal epithelium was placed on a sweat gland-inducing dermis and then grafted onto a nude mouse, the corneal epithelium generated a fully differentiated epidermis containing sweat glands. Thus, it can be concluded that transit-amplifying cells already committed to one cell lineage can be reprogrammed.

In conclusion, these studies have furthered our understanding of epithelial stem cell biology. In order to develop additional technologies and tools for medical purposes and/or the evaluation of pharmaceutical products however, we need to further elucidate how the stem cell population as well as its progeny are regulated and to better understand the plasticity of cells already engaged in a differentiation pathway.

BIBLIOGRAPHIE

- Barrandon Y., Green H., Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1987, 84,2302-2306.
- Barrandon Y., The epidermal stem cells : an overview, *Developmental Biology*, 1993, 4, 209-215.
- Jones P.H., Harper S., Watt F.M., Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell*, 1995, 80, 83-93.
- Li A., Simmons P.J., Kaur P., Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, 95, 3902-3907.
- Commo S., Gaillard O., Bernard B.A., The human hair follicle contains two distinct K19 positive compartments in the outer root sheath : a unifying hypothesis for stem cell reservoir? *Differentiation*, 2000, 66, 157-64.
- Parsa R., Yang A., McKeon F., Green H., Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes, *J Invest. Dermatol.*, 1999, 113, 1099-1105.
- Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Bronson R.T., Tabin C., Sharpe A., Caput D., Crum C., McKeon F., p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development, *Nature*, 1999, 398, 714-718.
- Fortunel N.O., Hatzfeld A., Hatzfeld J.A., Transforming growth factor- β : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis, *Blood*, 2000, 96, 2022-2036.
- Ferraris C., Bernard B.A., Dhouailly D., Adult epidermal keratinocytes are endowed with pilosebaceous forming abilities. *Int J. Dev. Biol.*, 1997, 41,491-498.
- Ferraris C., Chevalier G., Favier B., Jahoda C.A.B., Dhouailly D., Adult corneal epithelium basal cells possess the capacity to activate epidermal, pilosebaceous and sweat gland genetic programs in response to embryonic dermal stimuli. *Development*, 2000, 127, 5487-5495.