

Cellules souches de l'épiderme interfolliculaire humain : phénotypes et potentialités

Nicolas O. Fortunel et Michèle T. Martin

Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (iRCM) Service Cellules Souches et Radiation (SCSR) Laboratoire de Génomique et Radiobiologie de la Kératinopoièse (LGRK) 2, rue Gaston Crémieux CP 5722, 91057 Evry Cedex, France

Auteur correspondant : Nicolas O. Fortunel, nicolas.fortunel@cea.fr

Reçu le 13 Décembre 2007

Résumé – Des cellules souches d'origines tissulaires distinctes ont en commun un certain nombre de caractéristiques fondamentales, parmi lesquelles la capacité d'auto-renouvellement et le potentiel de régénération de leur tissu d'appartenance. Trouver des critères d'identification de populations particulières de cellules souches et comprendre les réseaux de signalisation responsables de leur état d'immaturation et du maintien de leur potentiel constituent des domaines de recherche majeurs qui conduiront à une connaissance plus aboutie de la physiologie normale des cellules souches adultes, et conséquemment à augmenter notre aptitude à les utiliser pour des thérapies régénératives. Cette synthèse traitera de différentes approches et modèles expérimentaux qui ont été développés dans ce domaine, et qui ont contribué à approfondir notre connaissance des cellules souches de l'épiderme interfolliculaire humain. L'une d'elle, basée sur des études transcriptionnelles menées à l'échelle du génome global, a consisté à rechercher des marqueurs moléculaires universels à tous les types de cellules souches. Dans d'autres approches, les cellules souches ont été étudiées de manière moins globale, en s'intéressant à certaines de leurs caractéristiques spécifiques. La compréhension des propriétés des cellules souches somatiques, comme leur état de quiescence ou leur potentiel de détoxification, ont notamment conduit à l'identification de phénotypes utilisables pour la sélection de sous-populations de kératinocytes possédant des propriétés de cellules souches. L'intérêt de ces différentes démarches sera discuté.

Mots clés : épiderme / kératinocyte / cellule souche / phénotype / organogenèse

Abstract – Stem cells from human interfollicular epidermis: phenotypes and potentialities.

Stem cells from different tissue origins share common characteristics, including self-renewal capacity and tissue regeneration potential. Finding criteria to identify particular stem cell types, and understanding signaling pathways responsible for stemness, represent major research areas that will lead to a better characterization of the normal state of stem cells, thus improving our capability to use them for regenerative therapies. We will review here different approaches and experimental models liable to increase our knowledge of stem cells from human interfollicular epidermis. One of them, based on transcriptional profiling performed at the level of the global genome, consisted in searching universal molecular markers of stem cells. In other approaches, stem cells were studied at the level of specific characteristics. Understanding somatic stem cell properties such as quiescence or slow cycling state, and detoxification potential, led to the identification of phenotypes suitable for the selection of epidermal keratinocyte sub-populations with stem cell properties. The specific interests of these different research strategies will be discussed.

Introduction

Au cours du développement des organismes pluricellulaires, les feuilletts embryonnaires sont constitués à partir de cellules souches initialement pluripotentes, qui restreignent progressivement leur potentiel d'organogenèse, et font place à différents types de cellules souches plus spécialisées, appelées cellules souches tissulaires. Une fois ce processus de construction achevé, la fonction des cellules souches devient celle de garants de l'intégrité du tissu auquel elles appartiennent. Durant toute la vie de l'individu, elles assurent alors le renouvellement cellulaire physiologique et permettent une activité de régénération en cas de lésions. Les cellules souches des tissus adultes partagent plusieurs caractéristiques fondamentales, parmi lesquelles la capacité d'autorenouvellement et l'aptitude à régénérer leur tissu d'appartenance. Sélectionner des cellules souches à partir de biopsies de tissus, puis les amplifier *in vitro* sans en altérer les caractéristiques, sont des questions centrales pour envisager leur utilisation en médecine régénérative. Les cellules souches de l'épiderme interfolliculaire sont au centre de ces enjeux car leur potentiel est depuis plusieurs années exploité dans le cadre de greffes.

L'épiderme interfolliculaire, notions générales

L'épiderme constitue la structure la plus superficielle de la peau. Ce tissu est composé d'une part d'un épithélium pluristratifié, appelé épiderme interfolliculaire, dont le rôle est notamment d'assurer une fonction dite de barrière vis-à-vis de l'environnement. L'épiderme comprend d'autre part différentes annexes, telles que les glandes sébacées, ou les follicules pileux, à partir desquels se développent, chez les mammifères, cheveux, poils et vibrisses.

Majoritairement constitué de kératinocytes, l'épiderme interfolliculaire se renouvelle tous les 28 jours en moyenne. Ce tissu est séparé en quatre couches, qui correspondent à quatre étapes du programme de différenciation des kératinocytes. Directement en contact avec le derme, les kératinocytes de la couche basale, encore appelée couche germinative (*stratum germinativum*), se caractérisent par un état indifférencié. En situation supra-basale, c'est au niveau de la couche dite épineuse (*stratum spinosum*) que débute le processus de kératinisation. La différenciation des kératinocytes se poursuit au niveau de la couche granuleuse (*stratum granulosum*) pour donner naissance aux précurseurs de la future couche cornée (*stratum corneum*). Cette dernière couche, la plus superficielle, est constituée de kératinocytes au stade terminal de leur programme de différenciation,

alors appelés cornéocytes. Ces cellules présentent la particularité d'être anucléées, tout comme le sont d'autres cellules différenciées comme par exemple les érythrocytes ou les plaquettes.

Le processus physiologique continu de renouvellement des différentes couches de kératinocytes constituant l'épiderme interfolliculaire est appelé kératinopoïèse.

Hiéarchie de potentiel au sein de la couche basale

L'épiderme est un tissu dynamique, dont le maintien de l'intégrité durant toute la vie de l'individu est intimement lié à la biologie des kératinocytes constituant sa couche basale. L'homéostasie épidermique résulte en effet d'une balance finement régulée entre prolifération et différenciation des kératinocytes basaux, qui permet d'assurer le renouvellement physiologique de ce tissu, ainsi que sa régénération en situation de lésion. La couche basale de l'épiderme interfolliculaire est le siège d'une activité de prolifération continue, qui conduit à alimenter les couches supra-basales en kératinocytes.

Les kératinocytes basaux sont loin de constituer une population cellulaire homogène, que ce soit au niveau de leur phénotype, ou de leurs potentialités. Parmi eux, se trouve un compartiment répondant à la définition de cellules souches, car ces cellules sont porteuses du potentiel de renouvellement et de régénération à long terme de leur tissu d'appartenance.

Cette importante fonction repose notamment sur la capacité d'autorenouvellement, qui permet de ne pas aboutir à une déplétion du réservoir de cellules souches au cours de la vie du tissu. Elle repose également sur l'aptitude des cellules souches à conserver de manière durable la capacité d'exécution du programme d'organogenèse inhérent à la constitution de l'épithélium épidermique. Bien que possédant un potentiel de prolifération très important, les cellules souches de l'épiderme interfolliculaire se trouvent majoritairement dans un état de quiescence ou de faible activité mitotique.

En aval du compartiment des cellules souches, et directement issu de celui-ci, un second compartiment de kératinocytes basaux répond à la définition de cellules progénitrices. Les progéniteurs se distinguent des cellules souches notamment par le fait qu'ils se trouvent dans un état de prolifération plus actif et qu'ils ne possèdent pas la capacité d'autorenouvellement à long terme de ces dernières. Après avoir effectué un nombre limité de divisions cellulaires au sein de la couche basale, les progéniteurs s'engagent invariablement vers la différenciation, et gagnent les

couches suprabasales de l'épiderme. Ainsi, ils assurent le renouvellement rapide à court terme de l'épiderme.

Au-delà de cette nomenclature pouvant suggérer une frontière stricte entre compartiment souche et progéniteur, il apparaît plus réaliste de considérer les kératinocytes basaux comme un ensemble hétérogène de cellules présentant des degrés d'immaturité variables, dont le potentiel représente en fait un *continuum*. En ce sens, la notion de cellule souche, au sein de l'épiderme interfolliculaire humain, définit donc le compartiment situé le plus en amont de la hiérarchie de la kératinopoïèse. Il est généralement admis que les kératinocytes basaux représentent environ 10 % de l'ensemble des kératinocytes de l'épiderme. Bien que la quantification des cellules souches présentes au sein de ce tissu demeure imprécise, il est admis que celles-ci constituent une sous-population rare, représentant de l'ordre de 0,1 à 1% des kératinocytes basaux.

Le potentiel de différenciation des cellules souches des tissus adultes est variable. Elles peuvent être multipotentes et donner naissance à plusieurs types cellulaires caractéristiques du tissu dont elles sont issues, ou leur potentiel de différenciation peut être plus restreint. Beaucoup étudié dans des modèles de rongeurs notamment, le réservoir de cellules souches épidermiques localisé au sein du follicule pileux est connu pour être capable de contribuer au développement des follicules, mais aussi dans certaines circonstances à la régénération de l'épiderme interfolliculaire et de ses annexes. La multipotentialité des cellules souches présentes au sein de la couche basale de l'épiderme interfolliculaire, notamment dans la peau humaine, n'est pas exclue, mais elle reste à ce jour non démontrée.

Modélisation *in vitro* des propriétés fonctionnelles associées aux cellules souches de l'épiderme interfolliculaire

La hiérarchie de potentiel qui définit au sein de l'épiderme interfolliculaire les notions de cellules souches, de progéniteurs et de kératinocytes engagés dans la différenciation, repose sur des propriétés fondamentales qui constituent des clés de voûte pour le développement de tests fonctionnels visant à mettre en évidence ces cellules. Comme cela a été détaillé ci-dessus, les cellules souches possèdent par définition une capacité d'autorenouvellement importante, que ne possèdent pas les progéniteurs. Lorsqu'ils sont placés en culture, des kératinocytes présentant des propriétés de cellule souche doivent donc pouvoir conserver de manière durable un fort potentiel de prolifération, ainsi que l'aptitude à reconstruire l'épithélium épidermique. On attend en revanche une perte plus ou moins rapide de ces potentialités dans

le cas de progéniteurs. Sur un plan expérimental, ces fonctions ont été interprétées en termes de paramètres quantifiables au moyen de tests fonctionnels *in vitro*.

Le potentiel de croissance des kératinocytes basaux est notamment estimé par le biais d'une quantification de leur capacité clonogénique ou clonogénicité individuelle. Pour la réalisation de tests de clonogénicité, les kératinocytes sont ensemencés à faible densité, de manière à obtenir une croissance de colonies, ou bien individuellement, afin d'étudier rigoureusement leur potentiel de croissance à l'échelon clonal. Deux paramètres peuvent être pris en compte pour caractériser un potentiel clonogénique. L'efficacité clonogénique, CFE pour "*colony-forming efficiency*", correspond au pourcentage de cellules capables de donner naissance à un clone ou une colonie, parmi une population d'intérêt. La taille et la morphologie des colonies obtenues représentent des indicateurs du stade de différenciation ou d'immaturité des cellules étudiées.

Ainsi, une population de kératinocytes riche en cellules souches ou progéniteurs très immatures produira un nombre de colonies plus important (CFE élevée) qu'une population plus majoritairement constituée de progéniteurs plus matures et de kératinocytes engagés dans la différenciation (CFE basse). De plus, un kératinocyte immature produira une colonie de taille importante, très proliférative, alors qu'un kératinocyte mature ne produira au mieux qu'une colonie abortive.

Pour une analyse plus poussée, des clones issus d'une cellule unique peuvent être décollés individuellement, puis sub-cultivés à faible densité. Les clones issus de kératinocytes très immatures sont alors capables de donner naissance à une descendance de colonies secondaires de qualité majoritairement comparable à celle du clone primaire, alors que les clones issus de kératinocytes plus matures présentent une capacité de croissance diminuée lors de la sub-culture (Figure 1A). Ce type d'observations a conduit à désigner comme "holoclones" les clones issus de cellules souches épidermiques, comme "méroclones" les clones issus de progéniteurs précoces, et comme "paraclones", les clones issus de progéniteurs tardifs (Barrandon & Green, 1987).

L'estimation du potentiel de prolifération peut également être effectuée à une échelle globale, en initiant des cultures de masse à partir des populations ou sous-populations de kératinocytes d'intérêt. Afin de quantifier le potentiel de croissance des kératinocytes à long terme, les cultures sont entretenues et repiquées successivement autant de fois que le potentiel d'expansion des cellules le permet. Le potentiel d'expansion à long terme a été largement utilisé comme un des critères permettant de valider un procédé visant à obtenir un enrichissement des cellules souches de l'épiderme interfolliculaire.

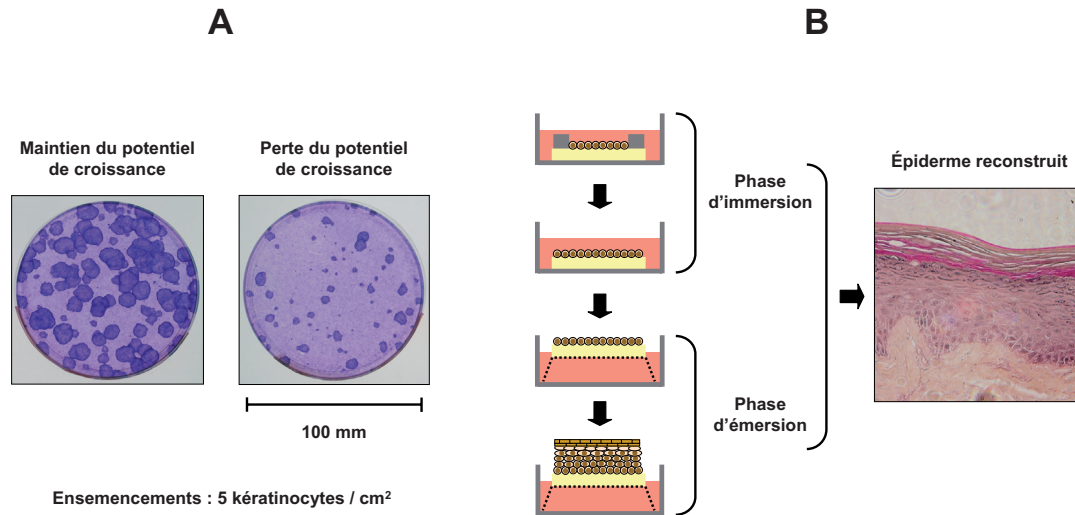


Fig. 1. Modèles fonctionnels *in vitro* utilisés pour étudier le potentiel des kératinocytes. A, Tests clonogéniques permettant d'estimer la capacité de kératinocytes à générer des colonies dont le nombre et les caractéristiques représentent des indicateurs du potentiel de croissance. B, Modèle d'organogenèse épidermique : reconstruction d'un épiderme tridimensionnel sur derme humain mort dé-épidermé. Description originale du modèle : Régnier *et al.*, 1986.

Ces tests de croissance ont permis de montrer que les kératinocytes basaux dotés du potentiel le plus important peuvent initier des cultures à long terme pouvant être maintenues durant plusieurs mois. Certaines cellules ont pu donner naissance à une descendance de taille suffisante pour non seulement reconstituer la couche basale de l'épiderme d'un individu adulte (production d'une descendance d'environ 10^{10} kératinocytes), mais aussi pour constituer celle de l'ensemble des humains de la planète (production d'une descendance atteignant plus de 10^{20} kératinocytes).

Une propriété fondamentale des cellules souches est leur capacité à assurer de manière durable la régénération du tissu auquel elles appartiennent. Dans le cas des cellules souches de l'épiderme, différents modèles organotypiques *in vitro* permettant de tester l'aptitude de populations de kératinocytes à reconstruire un épiderme pluristratifié ont été développés. Les plus simples sont basés sur l'utilisation d'un derme acellulaire, artificiel ou préparé à partir d'un échantillon de peau, sur lesquels sont ensemencés les kératinocytes dont on souhaite évaluer le potentiel d'organogenèse (Regnier *et al.*, 1986) (Figure 1B). D'autres modèles dits de peau complète comprennent un derme reconstruit contenant des fibroblastes vivants, ainsi qu'un épiderme reconstruit (Bell *et al.*, 1981). La capacité de reconstruction d'un épiderme tridimensionnel correctement différencié n'est pas exclusive aux cellules souches, puisque les cellules progénitrices en sont également capables à court terme. Il s'agit néanmoins d'un indicateur fondamental de maintien d'un potentiel régénératif, qu'il est particulièrement important de considérer lorsque des

kératinocytes sont amplifiés en culture dans un but clinique.

Intérêt clinique des progéniteurs et cellules souches épidermiques

Les chercheurs du domaine des cellules souches, quel que soit leur tissu d'intérêt, sont amenés à aborder un certain nombre d'axes communs. Des préoccupations inhérentes à l'utilisation de ces cellules en médecine régénérative sont notamment de parvenir à les quantifier et à les amplifier en culture sans altérer leurs caractéristiques.

Une application clinique particulièrement aboutie est la greffe d'un épithélium reconstruit pour le traitement de brûlures sévères (Pellegrini *et al.*, 1999; Ronfard *et al.*, 2000). Chez les grands brûlés, la peau peut être détruite en profondeur sur 40 à 90% de la surface corporelle, ce qui exclut toute possibilité de régénération spontanée, puisque la brûlure atteint la couche basale de l'épiderme, qui contient les progéniteurs et les cellules souches. Le traitement consiste alors à couvrir l'ensemble des zones lésées avec des greffons de peau reconstituée. Ces greffons sont produits à partir de cellules autologues, extraites de biopsies de peau saine de seulement quelques cm², puis amplifiées *ex vivo*. Les greffons ne sont pas produits à partir de cellules souches épidermiques purifiées, mais à partir de préparations totales de kératinocytes issues du tissu épidermique prélevé. Bien que cette technologie soit pratiquée par différentes équipes de par le monde, elle reste largement perfectible. D'une part,

dans la majorité des cas, les annexes cutanées comme les glandes sébacées et les glandes sudoripares ne se reforment pas, et l'élasticité ainsi que le potentiel de cicatrisation de l'épiderme greffé restent nettement inférieurs à ceux du tissu natif. D'autre part, bien que la fréquence des cellules souches présentes au sein des cultures conduisant à l'obtention des greffons soit un facteur déterminant pour la prise de greffe, aucun critère pronostic n'est actuellement disponible pour estimer ce paramètre avant l'issue du résultat clinique.

Un second type d'application clinique découlant des travaux sur les cellules souches épidermiques concerne le traitement de génodermatoses par thérapie génique. La faisabilité de telles approches a été démontrée grâce aux résultats d'un protocole développé pour tenter une correction génétique chez un homme âgé de 36 ans atteint d'une épidermolyse bulleuse jonctionnelle (Mavilio *et al.*, 2006). Cette maladie génétique est causée par une mutation au niveau du gène codant pour la sous-unité β 3 de la laminine 5. Il s'agit d'une pathologie sévère, létale dans de nombreux cas, qui se caractérise par une déficience au niveau de la jonction dermo-épidermique et conséquemment par une adhésion altérée entre l'épithélium épidermique et le derme. L'épiderme est donc progressivement atteint de multiples lésions chroniques. Il évolue vers une situation d'aplasie en raison d'un épuisement du compartiment des cellules souches, trop intensément sollicité pour soutenir un processus de régénération continu. Le protocole clinique a tout d'abord consisté à repérer une zone de peau encore suffisamment saine pour être utilisée comme source de cellules souches épidermiques à fort potentiel. Après avoir identifié la face palmaire des mains comme site anatomique adéquat, des biopsies de peau ont été prélevées au niveau de cette zone, afin d'en extraire les kératinocytes qui ont ensuite été traités selon un procédé comparable à celui utilisé pour des greffes classiques d'épiderme autologue reconstruit. La spécificité du protocole de thérapie génique utilisé a été de transduire les kératinocytes du patient au cours de la phase d'amplification *ex vivo* préalable à la reconstitution de l'épithélium destiné à être greffé. Les kératinocytes ont été transduits à l'aide d'un vecteur rétroviral permettant l'expression d'un transgène correspondant à l'ADNc fonctionnel de la laminine β 3. Les épidermes reconstruits corrigés génétiquement ont ensuite été greffés au niveau des cuisses du patient, qui présentaient des symptômes sévères de la maladie. Avec plus d'un an de recul après la réalisation du protocole, la correction génétique de la maladie s'avère stable au niveau des greffons. Le bénéfice clinique se montre particulièrement intéressant, puisque l'intégrité de la jonction dermo-épidermique retrouve des propriétés comparables à celles d'un tissu sain.

Ce résultat clinique illustre parfaitement la nécessité de développer des modèles fonctionnels permettant une mise en évidence d'un potentiel associé aux cellules souches épidermiques *in vitro* (Larcher *et al.*, 2007)

Recherche de critères moléculaires identifiant les cellules souches basée sur des approches globales

Une voie d'approche nécessaire consiste à focaliser ces efforts sur un type de cellules souches d'intérêt. Il peut néanmoins être particulièrement informatif d'alimenter la réflexion par des connaissances acquises par l'étude d'autres types de cellules souches, non nécessairement impliquées dans la biologie du tissu que l'on étudie.

La démarche qui consiste à utiliser une approche comparative pour étudier le programme génétique exprimé par les cellules souches a été proposée en 2002 et 2003 par plusieurs laboratoires indépendamment. Les groupes de Douglas Melton (Harvard) et de Ihor Lemischka (Princeton) ont réalisé, dans le modèle murin, une analyse génomique globale des cellules souches en utilisant la technologie des puces à ADN (Ivanova *et al.*, 2002; Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Ces équipes ont caractérisé et comparé le programme génétique exprimé par trois types distincts de cellules souches : cellules souches embryonnaires (CSE), cellules souches neurales obtenues à partir de neurosphères (CSN) et cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Figure 2A). Ils ont ainsi ouvert un débat scientifique portant sur l'existence potentielle de gènes universellement exprimés dans tous les types de cellules souches : gènes conférant les propriétés caractéristiques des cellules souches, désignés par le terme anglo-saxon de "*stemness genes*", qui pourrait être traduit en langue française par "gènes conférant un état souche".

Dans le but de creuser cette hypothèse, le groupe de Bing Lim (Harvard - Singapour) a réalisé, également dans le modèle murin, une étude de génomique des cellules souches, complémentaire à celle de D. Melton et I. Lemischka. Dans cette troisième étude, la comparaison a porté sur l'étude du transcriptome de CSE avec celui de deux types de cellules souches neuronales isolées à partir de stades embryonnaires précoces : CSN et cellules souches de ganglion rétinale (CSR) (Fortunel *et al.*, 2003a). Un aboutissement important de ce travail a été de fournir une analyse collective des données générées de manière indépendante par les trois groupes.

L'approche expérimentale utilisée par chacun des groupes a été de caractériser par puces à ADN les profils d'expression génique de chaque type de cellules souches étudié, puis de les comparer individuellement

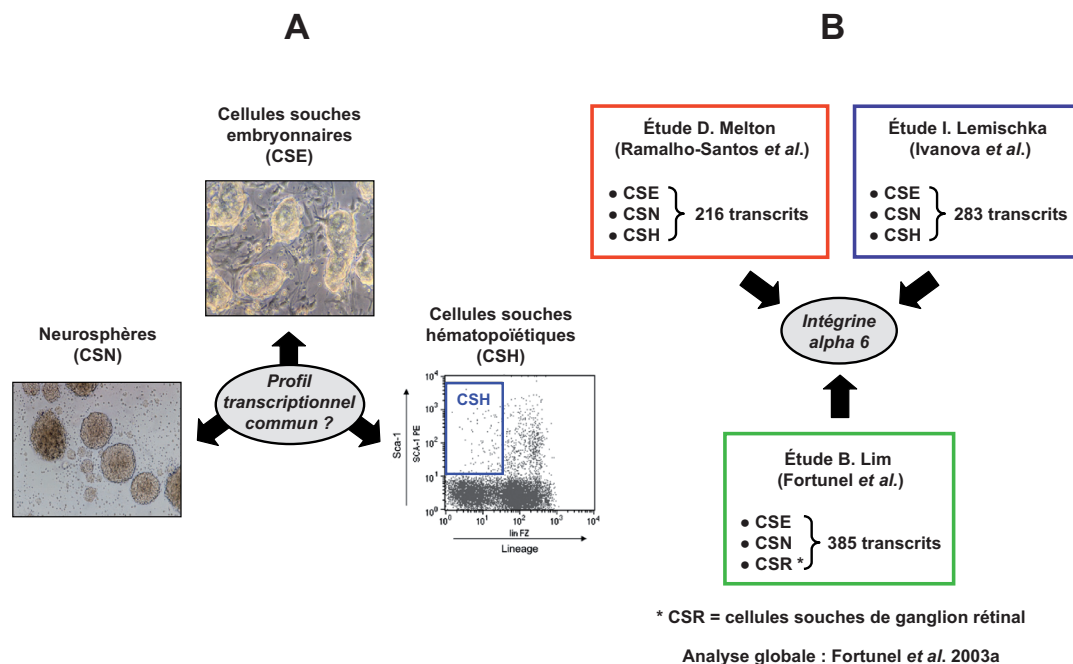


Fig. 2. Recherche de gènes universellement exprimés dans tous les types de cellules souches. A. Cellules souches utilisées dans différentes études menées chez la souris dans le but d'identifier un profil transcriptionnel commun. Cellules souches embryonnaires (CSE) ; cellules souches neurales (CSN) obtenues à partir de neurosphères ; cellules souches hématopoïétiques (CSH) triées par cytométrie en flux sur la base d'une expression du marqueur Sca-1, associée à une absence de marqueurs de différenciation correspondant aux différents lignages hématopoïétiques (phénotype *Lin*⁻). B. Analyse de la convergence de trois études menées indépendamment (Fortunel *et al.*, 2003a).

à celui de cellules matures correspondant à des stades de leur développement en aval. Des listes de transcrits ont été établies sur la base d'une expression détectable ou forte dans les cellules souches et faible ou indétectable dans les cellules matures. Les listes de gènes caractéristiques de chaque type de cellules souches ainsi générées ont ensuite été intersectées, aboutissant à la proposition d'une liste de gènes d'expression potentiellement commune à tous types de cellules souches : potentiels "stemness genes" universels.

Les résultats de cette analyse collective montrent que la concordance des trois études est bonne lorsqu'il s'agit d'analyser le transcriptome d'un type particulier de cellule souche. Il a notamment été déterminé que les trois études convergent pour identifier 200 à 300 gènes d'expression spécifique des CSE, parmi lesquels plusieurs candidats importants par ailleurs identifiés par des approches de biologie classique : par exemple *Oct-3/4*, *Nanog*, *Esg-1*. En revanche, l'analyse indique que les recouvrements des trois études diminuent de manière drastique en ce qui concerne les gènes d'expression commune à deux types de cellules souches (seulement près de dix gènes exprimés à la fois par les CSE et les CSN). Les recouvrements deviennent quasi inexistantes pour les gènes potentiellement exprimés dans l'ensemble des types de cellules

souches étudiés. Un unique "stemness gene" est identifié par recoupement des listes de transcrits issus des trois études indépendantes : l'intégrine $\alpha 6$ (*Itg \alpha 6*) (Figure 2B).

L'analyse statistique des banques de données générées indépendamment ne permet pas de remettre en cause l'hypothèse d'un groupe de gènes conférant les propriétés communes à tous les types de cellules souches. Ce travail montre que les gènes universels de l'état souche, s'ils existent, ne sont pas identifiables sur la base d'un fort différentiel d'expression par rapport à des cellules différenciées ayant perdu le caractère souche. L'homogénéité des populations de cellules souches étudiées, les conditions de cultures utilisées pour leur obtention, ainsi que différents aspects techniques inhérents à ce type d'approches expérimentales, sont des paramètres clés auxquels il conviendra de réfléchir en profondeur pour progresser dans la compréhension du programme génétique des cellules souches. D'autre part, cette réflexion soulève la question de considérer non pas l'expression de groupes transcrits strictement communs, mais de réaliser l'analyse à l'échelle de réseaux génétiques. L'importance de ces concepts scientifiques a été soulignée dans un commentaire de la chroniqueuse scientifique de la revue *Science* (Vogel, 2003).

Bien que l'analyse de convergence des trois études indépendantes ne conduise à identifier qu'un unique gène candidat, ce qui peut paraître anecdotique, celui-ci s'avère loin d'être dénué de sens dans le contexte de la biologie des cellules souches, y compris lorsqu'on effectue une transposition à l'espèce humaine. En effet, l'intégrine $\alpha 6$ est effectivement proposée comme marqueur pour sélectionner certaines sous-populations de cellules souches neurales (Hall *et al.*, 2006). De même, cette protéine est, comme on s'y attendait, exprimée par les progéniteurs et cellules souches hématopoïétiques, avec une implication dans le contrôle des phénomènes de migration vers leurs sites physiologiques de localisation (terme anglo-saxon de "homing") (Qian *et al.*, 2006, 2007). Proposée sur la base des résultats de génomique comme marqueur potentiellement associé à différents types de cellules souches, l'intégrine $\alpha 6$ est effectivement exprimée par d'autres types de cellules souches que celles utilisées pour ces études. En effet, l'expression de ce marqueur est par exemple observée à la surface de cellules souches hépatiques (Suzuki *et al.*, 2000; Laurson *et al.*, 2007) et de certaines populations de cellules souches germinales (Shinohara *et al.*, 1999; Kubota *et al.*, 2003).

L'unique potentiel "stemness genes" identifié se montre également de toute première importance dans le modèle de l'épiderme interfolliculaire. Différents auteurs proposent d'associer aux cellules souches et progéniteurs présents au sein de la couche basale un phénotype de forte expression de molécules de la famille des intégrines, parmi lesquelles la sous-unité *Itg $\alpha 6$* (Jones *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998, 2004; Webb *et al.*, 2004). D'un point de vue fonctionnel, ce récepteur d'adhésion participe au maintien de la cohésion de la jonction dermo-épidermique (Georges-Labouesse *et al.*, 1996). Cette intégrine est également décrite pour participer au maintien de l'état indifférencié des kératinocytes basaux (Rodius *et al.*, 2007), ainsi qu'au contrôle de l'activité de prolifération de ces cellules (Mainiero *et al.*, 1997).

Exploration de similitudes fonctionnelles existant entre cellules souches d'origines tissulaires distinctes

Une seconde manière de tirer profit des propriétés communes à différents types de cellules souches pour concevoir une recherche visant à identifier de nouveaux marqueurs peut reposer, non pas sur l'identification de transcrits et protéines d'expression commune, mais sur une interprétation moins stricte de caractéristiques fonctionnelles communes. Par exemple, tout comme l'épiderme interfolliculaire, le système hématopoïétique est un tissu dynamique

en renouvellement continu, dont l'homéostasie est maintenue de manière stable grâce à un compartiment de cellules souches faiblement représenté. Dans ces deux systèmes, le compartiment des cellules souches peut donc être distingué des cellules progénitrices par un état de quiescence ou de faible activité mitotique. D'autre part, les cellules souches exerçant la fonction de garant à long terme de l'intégrité des tissus, elles possèdent dans ces deux tissus une capacité de détoxification supérieure à celle de cellules plus matures.

Profil d'expression de récepteurs membranaires.

Le contrôle du cycle cellulaire des cellules souches résulte d'une balance entre signaux mitogènes et inhibiteurs du cycle cellulaire. Dans le système hématopoïétique, les stimulations et réponses mitogènes de ces cellules impliquent par exemple le couple constitué du récepteur à tyrosine kinase FLT3 (Rosnet *et al.*, 1991, 1993) et de son ligand le FL (Lyman *et al.*, 1993; Hannum *et al.*, 1994), dont l'action peut être réprimée par un facteur antiprolifératif, le TGF- $\beta 1$ (Fortunel *et al.*, 1998). Plus globalement, la synthèse des études menées dans l'équipe de Jacques Hatzfeld (CNRS) pour comprendre le rôle du TGF- $\beta 1$ a conduit à proposer un modèle de travail qui positionne ce facteur comme un régulateur central de l'autorenouvellement des progéniteurs et cellules souches hématopoïétiques (Fortunel *et al.*, 2000). Une originalité de la stratégie développée a été d'établir un phénotype sur la base du niveau d'expression de récepteurs membranaires connus pour exercer un effet mitogénique ou pour être associés à la prolifération des progéniteurs et cellules souches. Sous l'action d'inhibiteurs tels que le TGF- $\beta 1$, les cellules les plus immatures présentent un phénotype caractéristique "récepteurs mitogéniques faible" qui permet de les enrichir en réalisant un tri par cytométrie en flux. Ce phénotype concerne notamment une faible expression du récepteur FLT3, ainsi que du récepteur de la transferrine (Trf-R), dont le niveau d'expression corrèle également avec l'activité de prolifération cellulaire (Figure 3A).

Selon ce modèle, le contrôle de l'autorenouvellement des progéniteurs et cellules souches pourrait résulter d'un équilibre finement régulé entre, d'une part, l'effet antiprolifératif du TGF- $\beta 1$ qui contribuerait à les conserver dans un état de quiescence ou de faible activité mitotique et, d'autre part, la capacité de ce facteur à maintenir l'état d'immaturité des cellules souches au cours des divisions successives (Batard *et al.*, 2000).

Une des perspectives que nous tenions à explorer était la possibilité d'extrapoler tout ou partie

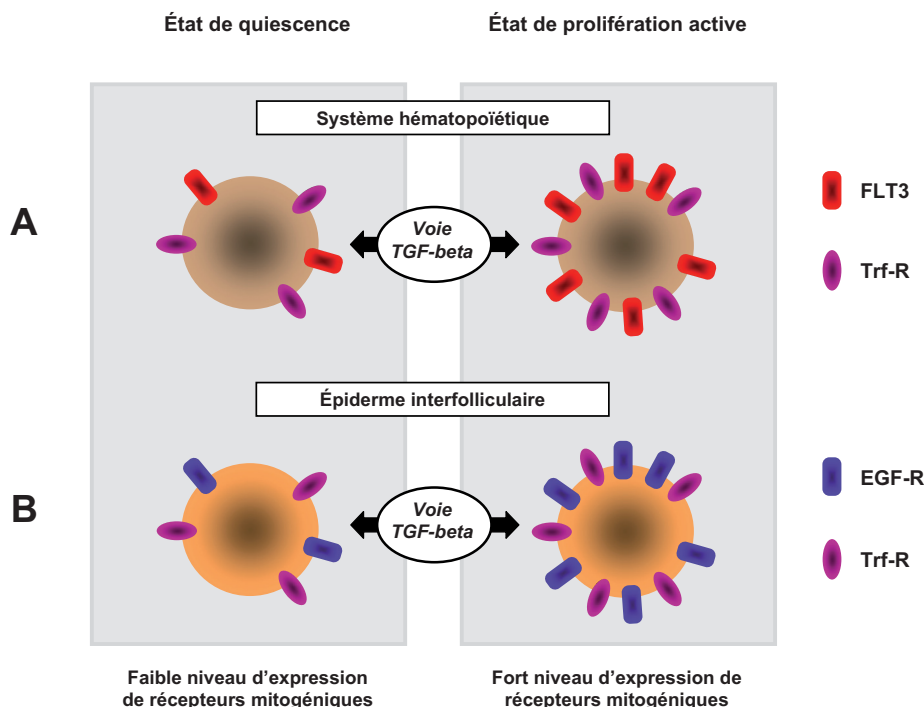


Fig. 3. Phénotypes permettant de distinguer les progéniteurs et cellules souches se trouvant dans un état de quiescence des cellules se trouvant dans un état de prolifération active. Notion de faibles versus forts niveaux d'expression de récepteurs mitogéniques : parallèles entre le système hématopoïétique (A) et l'épiderme interfolliculaire (B) humains.

de la stratégie mise en œuvre dans le modèle hématopoïétique à l'étude des cellules souches d'une autre origine tissulaire : celles de l'épiderme interfolliculaire. Comme dans le système hématopoïétique, nous avons évalué l'efficacité d'une sélection sur la base du phénotype " *récepteurs mitogéniques faible* " pour enrichir le compartiment des cellules souches épidermiques. Pour la définition de ce phénotype, notre choix a porté sur un récepteur à tyrosine kinase, celui de l'EGF (EGF-R).

Ce couple récepteur/ ligand exerce en effet un rôle central dans différents aspects de la biologie des kératinocytes. La voie de signalisation EGF/ EGF-R est en effet essentielle au maintien de l'homéostasie de l'épithélium épidermique, ainsi qu'à sa capacité de régénération (Haase *et al.*, 2003). L'EGF est impliqué dans le contrôle de la prolifération et de la motilité des kératinocytes (Barrandon & Green, 1987). Il participe également au maintien de l'état d'immaturité des kératinocytes basaux (Peus *et al.*, 1997), et favorise leur survie (Rodeck *et al.*, 1997) en inhibant la mort par apoptose (Stoll *et al.*, 1998). L'EGF est utilisé depuis longue date comme mitogène entrant dans la composition des milieux de culture pour kératinocytes (Maciag *et al.*, 1981 ; Boyce & Ham, 1983).

Un tri par cytométrie en flux sur la base du niveau d'expression de l'EGF-R a donc été réalisé à

partir d'une population pré-enrichie en kératinocytes basaux, grâce à leur forte capacité d'adhésion sur collagène. Parmi cette population, les cellules possédant le potentiel d'expansion à long terme le plus important et la capacité à générer un épiderme reconstruit la plus durable se sont avérées être enrichies dans une sous-population présentant le phénotype *EGF-R faible*, conformément à ce qui était attendu (Fortunel *et al.*, 2003b).

L'investigation du second aspect du modèle a permis de mettre en évidence une fonction jusque là non identifiée du TGF- β 1, qui est de favoriser l'expansion de kératinocytes primitifs indifférenciés. L'effet inhibiteur largement décrit de ce facteur sur le cycle cellulaire des kératinocytes a été observé à des concentrations supérieures ou égales à 100 pg/ml. L'originalité de ce travail a été de tester l'effet de doses de TGF- β 1 physiologiques mais extrêmement faibles, de l'ordre de 10 à 30 pg/ml, qui ont permis d'obtenir une production accrue et plus durable dans le temps de progéniteurs épidermiques fonctionnels dans des cultures à long terme. Une analyse phénotypique des cellules amplifiées en présence de faibles doses de TGF- β 1 indique un niveau d'expression plus élevé des intégrines α 6 et β 1, ce qui traduit un degré d'immaturité plus important (Fortunel *et al.*, 2003b). Il convient de souligner le fait qu'un faible niveau d'expression du

récepteur de la transferrine (Trf-R) est d'autre part actuellement considéré comme un critère phénotypique de référence pour le tri d'une sous-population enrichie en cellules souches de l'épiderme interfolliculaire (Li *et al.*, 1998, 2004). Les résultats de ces travaux indépendants permettent de proposer un schéma comparable au modèle hématopoïétique (Figure 3B).

Critère basé sur le potentiel de détoxification des cellules souches.

La sélection de sous-populations de kératinocytes enrichies en cellules souches épidermiques sur la base du niveau d'expression de récepteurs membranaires n'est applicable que lorsque ces cellules sont étudiées immédiatement après extraction de biopsies de peau. En effet, l'adaptation nécessaire à la croissance *in vitro* induit des modifications du phénotype membranaire rendant ces marqueurs inutilisables lorsqu'on travaille sur des populations de cellules en culture. Ces modifications peuvent notamment concerner des molécules d'adhésion telles que les intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$, mais aussi des récepteurs impliqués dans le contrôle de l'état prolifératif des kératinocytes comme par exemple le récepteur de l'EGF et celui de la transferrine.

Dans le cadre d'une recherche de critères valides pour repérer et sélectionner des cellules souches épidermiques présentes au sein de populations de kératinocytes placés en culture, l'équipe CEA a évalué la possibilité d'extrapoler à l'épiderme les résultats d'une étude princeps proposant une approche mise au point pour isoler des cellules souches hématopoïétiques. Basée sur la capacité des cellules souches à excréter efficacement des drogues et colorants, cette méthode consiste à trier par cytométrie en flux une sous-population minoritaire dite "SP" pour "*side population*", identifiée par sa capacité d'exclusion du colorant fluorescent Hoechst 33342 (Goodell *et al.*, 1996, 1997). Une sous-population répondant au critère SP a effectivement pu être détectée et triée parmi un pool de kératinocytes amplifiés *in vitro*. L'étude de la fonctionnalité des kératinocytes SP montre qu'il s'agit de cellules à fort potentiel régénératif, notamment capables de générer un épiderme pluristratifié correctement organisé et différencié après avoir effectué plus de 45 doublements de population en culture (Larderet *et al.*, 2006).

Il est intéressant de noter que d'autres cellules souches sont dotées de la machinerie de pompes nécessaire au phénomène d'exclusion du Hoechst 33342, ce qui conduit à considérer la possibilité d'appliquer cette stratégie de sélection à différents tissus (Zhou *et al.*, 2001). Cela a notamment été le cas dans des études menées sur les précurseurs du muscle

strié squelettique (Asakura *et al.*, 2002; Meeson *et al.*, 2004) et du muscle cardiaque (Oyama *et al.*, 2007), ainsi que sur des cellules souches neuronales de la rétine (Bhattacharya *et al.*, 2007).

Bilan

Les différentes approches évoquées dans cette synthèse fournissent des outils utilisables pour aborder la caractérisation des différentes sous-populations de kératinocytes pouvant être obtenues à partir de la couche basale de l'épiderme interfolliculaire, mais aussi pour mieux comprendre l'hétérogénéité de potentiel existant au sein de cultures *in vitro* de kératinocytes. Ces méthodes, développées dans le but de pouvoir individualiser le compartiment des cellules souches de celui des progéniteurs, se sont effectivement avérées valides pour séparer des sous-populations de kératinocytes aux potentialités non équivalentes. Bien que les systèmes de culture indépendamment utilisés par les différentes équipes pour les études fonctionnelles possèdent chacun leurs spécificités, les différents critères proposés ont permis d'obtenir des sous-populations capables d'effectuer en culture de l'ordre de 50 à 60 doublements moyens de population, mais aussi de conserver une capacité de reconstruction tissulaire satisfaisante au cours de cette expansion.

Il convient néanmoins de faire le constat que l'état de l'art actuel ne fournit aucun moyen de sélectionner, à partir de biopsies cutanées, des préparations homogènes de kératinocytes primaires capables de soutenir des niveaux d'expansion en culture systématiquement comparables à ceux décrits pour certains kératinocytes définis comme holo-clones. Cet objectif, s'il peut être atteint, nécessitera non seulement de progresser dans la connaissance des caractéristiques intrinsèques des cellules souches épidermiques elles-mêmes, mais aussi une réflexion approfondie portant sur les systèmes de culture à utiliser ou concevoir pour révéler l'étendue du potentiel de ces passionnantes cellules.

Références

- Asakura A., Seale P. Girgis-Gabardo A., Rudnicki M.A., Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J. Cell. Biol.*, 2002, 159, 123-134.
- Barrandon Y. & Green H., Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987a, 84, 2302-2306.
- Barrandon Y. & Green H., Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies : the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell*, 1987b, 50, 1131-1137.

- Batard P., Monier M.N., Fortunel N., Ducos K., Sansilvestri-Morel P., Phan T., Hatzfeld A., Hatzfeld J.A., TGF-beta1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *J. Cell. Sci.*, 2000, 113, 383-390.
- Bell E., Ehrlich H.P., Buttle D.J., Nakatsuji T., Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*, 1981, 211, 1052-1054.
- Bhattacharya S., Das A., Mallya K., Ahmad I., Maintenance of retinal stem cells by Abcg2 is regulated by notch signaling. *J. Cell. Sci.*, 2007, 120, 2652-2662.
- Boyce S.T. & Ham R.G., Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.*, 1983, 81, 33s-40s.
- Fortunel N., Batard P., Hatzfeld A., Monier M.N., Panterne B., Lebkowski J., Hatzfeld J., High proliferative potential-quiescent cells : a working model to study primitive quiescent hematopoietic cells. *J. Cell. Sci.*, 1998, 111, 1867-175.
- Fortunel N.O., Hatzfeld J.A., Hatzfeld J.A., Transforming growth factor-beta : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*, 2000, 96, 2022-2036.
- Fortunel N.O., Otu H.H., Ng H.H., Chen J., Mu X., Chevassut T., Li X., Joseph M., Bailey C., Hatzfeld J.A., Hatzfeld A., Usta F., Vega V.B., Long P.M., Libermann T.A., Lim B., Comment on " 'Stemness' : transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature". *Science*, 2003a, 302, 393.
- Fortunel N.O., Hatzfeld J.A., Rosemary P.A., Ferraris C., Monier M.N., Haydout V., Longuet J., Brethon B., Lim B., Castiel I., Schmidt R., Hatzfeld A., Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells : promotion of extensive amplification by low TGF-beta1 concentrations. *J. Cell. Sci.*, 2003b, 116, 4043-4052.
- Georges-Labouesse E., Messaddeq N., Yehia G., Cadalbert L., Dierich A., Le Meur M., Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat. Genet.*, 1996, 13, 370-373.
- Goodell M.A., Brose K., Paradis G., Conner A.S., Mulligan R.C., Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.*, 1996, 183, 1797-1806.
- Goodell M.A., Rosenzweig M., Kim H., Marks D.F., DeMaria M., Paradis G., Grupp S.A., Sieff C.A., Mulligan R.C., Johnson R.P., Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat. Med.*, 1997, 3, 1337-1345.
- Haase I., Evans R., Pofahl R., Watt F.M., Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *J. Cell. Sci.*, 2003, 116, 3227-3238.
- Hall P.E., Lathia J.D., Miller N.G., Caldwell M.A., French-Constant C., Integrins are markers of human neural stem cells. *Stem Cells*, 2006, 24, 2078-2084.
- Hannum C., Culpepper J., Campbell D., McClanahan T., Zurawski S., Bazan J.F., Kastelein R., Hudak S., Wagner J., Mattson J. *et al.*, Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature*, 1994, 368, 643-648.
- Ivanova N.B., Dimos J.T., Schaniel C., Hackney J.A., Moore K.A., Lemischka I.R., A stem cell molecular signature. *Science*, 2002, 298, 601-604.
- Jones P.H., Harper S., Watt F.M., Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell*, 1995, 80, 83-93.
- Kubota H., Avarbock M.R., Brinster R.L., Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, 100, 6487-6492.
- Larcher F., Dellambra E., Rico L., Bondanza S., Murillas R., Cattoglio C., Mavilio F., Jorcano J.L., Zambruno G., Del Rio M., Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety pre-assessment of cutaneous gene therapy. *Mol. Ther.*, 2007, 15, 1670-1676.
- Larderet G., Fortunel N.O., Vaigot P., Cegalerba M., Maltère P., Zobiri O., Gidrol X., Waksman G., Martin M.T., Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells*, 2006, 24, 965-974.
- Laurson J., Selden C., Clements M., Mavri-Damelin D., Coward S., Lowdell M., Hodgson H.J., Putative human liver progenitor cells in explanted liver. *Cells Tissues Organs*, 2007, 186, 180-191.
- 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. U. S. A.*, 1998, 95, 3902-3907.
- Li A., Pouliot N., Redvers R., Kaur P., Extensive tissue-regenerative capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny. *J. Clin. Invest.*, 2004, 113, 390-400.
- Mainiero F., Murgia C., Wary K.K., Curatola A.M., Pepe A., Blumemberg M., Westwick J.K., Der C.J., Giancotti F.G., The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *EMBO J.*, 1997, 16, 2365-2375.
- Maciag T., Nemore R.E., Weinstein R., Gilchrist B.A., An endocrine approach to the control of epidermal growth : serum-free cultivation of human keratinocytes. *Science*, 1981, 211, 1452-1454.
- Mavilio F., Pellegrini G., Ferrari S., Di Nunzio F., Di Iorio E., Recchia A., Maruggi G., Ferrari G., Provasi E., Bonini C., Capurro S., Conti A., Magnoni C., Giannetti A., De Luca M., Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat. Med.*, 2006, 12, 1397-1402.
- Lyman S.D., James L., Vanden Bos T., de Vries P., Brasel K., Gliniak B., Hollingsworth L.T., Picha K.S., McKenna H.J., Splett R.R. *et al.*, Molecular cloning

- of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor : a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell*, 1993, 75, 1157-1167.
- Meeson A.P., Hawke T.J., Graham S., Jiang N., Elterman J., Hutcheson K., Dimaio J.M., Gallardo T.D., Garry D.J., Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. *Stem Cells*, 2004, 22, 1305-1320.
- Oyama T., Nagai T., Wada H., Naito A.T., Matsuura K., Iwanaga K., Takahashi T., Goto M., Mikami Y., Yasuda N., Akazawa H., Uezumi A., Takeda S., Komuro I., Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J. Cell. Biol.*, 2007, 176, 329-341.
- Pellegrini G., Ranno R., Stracuzzi G., Bondanza S., Guerra L., Zambruno G., Micali G., De Luca M., The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation*, 1999, 68, 868-879.
- Peus D., Hamacher L., Pittelkow M.R., EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, 1997, 109, 751-756.
- Qian H., Tryggvason K., Jacobsen S.E., Ekblom M., Contribution of alpha6 integrins to hematopoietic stem and progenitor cell homing to bone marrow and collaboration with alpha4 integrins. *Blood*, 2006, 107, 3503-3510.
- Qian H., Georges-Labouesse E., Nyström A., Domogatskaya A., Tryggvason K., Jacobsen S.E., Ekblom M., Distinct roles of integrins alpha6 and alpha4 in homing of fetal liver hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 2007, 110, 2399-2407.
- Ramalho-Santos M., Yoon S., Matsuzaki Y., Mulligan R.C., Melton D.A., "Stemness" : transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science*, 2002, 298, 597-600.
- Regnier M., Schweizer J., Michel S., Bailly C., Prunieras M., Expression of high molecular weight (67K) keratin in human keratinocytes cultured on dead de-epidermized dermis. *Exp. Cell. Res.*, 1986, 165, 63-72.
- Rodeck U., Jost M., Kari C., Shih D.T., Lavker R.M., Ewert D.L., Jensen P.J., EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. *J. Cell. Sci.*, 1997, 110, 113-121.
- Rodius S., Indra G., Thibault C., Pfister V., Georges-Labouesse E., Loss of alpha6 integrins in keratinocytes leads to an increase in TGFbeta and AP1 signaling and in expression of differentiation genes. *J. Cell. Physiol.*, 2007, 212, 439-449.
- Ronfard V., Rives J.M., Neveux Y., Carsin H., Barrandon Y., Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation*, 2000, 70, 1588-1598.
- Rosnet O., Marchetto S., deLapeyriere O., Birnbaum D., Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene*, 1991, 6, 1641-1650.
- Rosnet O., Schiff C., Pébusque M.J., Marchetto S., Tonnellet C., Toiron Y., Birg F., Birnbaum D., Human FLT3/FLK2 gene : cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood*, 1993, 82, 1110-1119.
- Shinohara T., Avarbock M.R., Brinster R.L., beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, 96, 5504-5509.
- Stoll S.W., Benedict M., Mitra R., Hiniker A., Elder J.T., Nuñez G., EGF receptor signaling inhibits keratinocyte apoptosis : evidence for mediation by Bcl-XL. *Oncogene*, 1998, 16, 1493-1499.
- Suzuki A., Zheng Y., Kondo R., Kusakabe M., Takada Y., Fukao K., Nakauchi H., Taniguchi H., Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology*, 2000, 32, 1230-1239.
- Vogel G., Stem cells. 'Stemness' genes still elusive. *Science*, 2003, 302, 371.
- Webb A., Li A., Kaur P., Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation*, 2004, 72, 387-395.
- Zhou S., Schuetz J.D., Bunting K.D., Colapietro A.M., Sampath J., Morris J.J., Lagutina I., Grosveld G.C., Osawa M., Nakauchi H., Sorrentino B.P., The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.*, 2001, 7, 1028-1034.