

Dioxine et cellules souches : la double peine

Benoît MIOTTO et Anne LETESSIER | Benoit.miotto@inserm.fr

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

Mots clés : **Cancer, cellules souches, différenciation cellulaire, dioxine, polluants persistants**

La dioxine (ou TCDD*) est un composé chimique classé cancérigène par l'OMS*. Ce polluant organique persistant émis dans les gaz d'origine automobile ou industrielle est présent dans l'air que nous respirons ainsi que dans notre alimentation. L'alimentation est d'ailleurs la source majeure de l'exposition humaine au TCDD, suite à l'ingestion d'aliments (œuf, lait, poisson, viande...) issus d'animaux contaminés. Les effets néfastes des dioxines sur la santé sont avérés et de plus en plus documentés dans la population humaine. Il a ainsi été montré que l'exposition à la dioxine est liée à l'incidence de certains cancers et à des défauts du système immunitaire (1-4). Plusieurs politiques de santé publique, notamment en France et en Europe ont d'ailleurs pour objectifs de limiter la production et le rejet des dioxines ainsi que l'exposition des individus à ces composés (renforcement des contrôles et des normes, abattage des animaux contaminés...). Comprendre comment la dioxine perturbe le fonctionnement de la cellule est donc essentiel. Cela permettra à terme de mieux évaluer les risques biologiques associés aux dioxines et de permettre une meilleure politique de prévention et de prise en charge des personnes. Le TCDD est un activateur du récepteur aux xénobiotiques AHR*, qui est un facteur de transcription essentiel à la cellulaire, et qui joue un rôle dans le contrôle des effets toxiques des dioxines et autres polluants de l'environnement. Des études récentes montrent qu'AHR serait impliqué, physiologiquement, dans le contrôle du cycle cellulaire, dans la modulation du système immunitaire, dans le développement embryonnaire, dans le renouvellement et la différenciation des cellules souches.

Les deux articles de cette note s'intéressent aux conséquences de l'activation d'AHR par le TCDD dans le devenir des cellules souches* normales et cancéreuses*. Dans l'article de Li et al., les auteurs montrent que le TCDD, en activant AHR, altère l'engagement des cellules souches hématopoïétiques (CSH*) dans la lymphopoïèse B*. Dans l'article d'Al-Dhfyhan et al., les auteurs montrent que le TCDD favorise l'expansion des cellules souches cancéreuses mammaires (CSCM*) via AHR et que cela a un impact sur la réponse aux traitements utilisés en clinique.

Ces deux publications permettent une description plus aboutie du rôle d'AHR dans les cellules souches normales et cancéreuses et de l'effet du TCDD sur ces mêmes cellules.

L'activation du récepteur aux xénobiotiques AHR par la dioxine altère la lymphopoïèse B chez l'Homme.

Li J. et al. (2017). Aryl hydrocarbon receptor activation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs human B lymphopoiesis. *Toxicology*, vol. 378: p.17-24.

Résumé

Dans cette étude, les auteurs analysent l'effet de la dioxine (TCDD), activateur d'AHR, sur la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) en lymphocyte B. Cette étude s'inspire de plusieurs observations indiquant que certains antagonistes d'AHR favorisent l'expansion des cellules souches hématopoïétiques (CSH) (5). Un modèle cellulaire est développé, dans lequel des cellules souches issues de cordons embryonnaires sont co-cultivées avec des cellules du stroma de la moelle épinière et un cocktail de cytokines*. Dans ce modèle, les CSH se différencient à 20 jours de cultures, en progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) puis éventuellement en lymphocytes B. Ces cellules expriment des marqueurs moléculaires qui permettent leur identification par la technique de FACS*, à l'aide d'anticorps spécifiques. Grâce à ce modèle les auteurs ont pu tester l'effet de l'exposition à J0 de doses croissantes de TCDD (de 1 à 30nM) sur le devenir des CSH au cours de la

différenciation. Le nombre total de cellules diminue de façon significative même à la plus faible concentration de TCDD et cette diminution n'est pas liée à l'augmentation de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. Le nombre de cellules exprimant le marqueur de surface CD34, spécifique des CSH actives, diminue également de façon significative ainsi que le niveau d'expression moyen de CD34 par cellule. Les auteurs montrent aussi que plusieurs molécules agonistes d'AHR, et dérivées du TCDD, bloquent également la prolifération des CSH. Ces molécules induisent une diminution du nombre de cellules totales, du nombre de cellules exprimant le marqueur CD34 et du niveau d'expression de CD34. De plus l'effet de ces molécules serait directement proportionnel à leur capacité à activer AHR. Les auteurs montrent enfin que les CSH sont capables de se différencier en pré-lymphocytes B au cours de l'expérience, même en présence de TCDD, en analysant le marqueur CD19 par FACS. Le marqueur CD19 est spécifique des cellules engagées dans la lymphopoïèse B. Toutefois, le nombre de cellules CD19 positives est significativement diminué quel que soit la concentration de TCDD utilisée, ce qui suggère que l'engagement des CSH dans la lymphopoïèse B est compromise et que le TCDD induit une altération précoce du développement des lymphocytes B. Les auteurs valident ces résultats en utilisant des CSH cultivées sans cellules du stroma de la moelle épinière. Les auteurs concluent que l'activation d'AHR par le TCDD a un

rôle direct sur les CSH, que le TCDD altère le développement des CSH en lymphocytes B, et que le TCDD peut avoir un impact significatif sur l'immunité humorale*.

Commentaire

L'intérêt de cet article repose sur le fait que la sensibilité des CSH au TCDD est étudiée pour la première fois, certes *in vitro*, dans des cellules humaines. Afin de mieux comprendre les effets biologiques du TCDD sur les CSH, les auteurs utilisent un système de co-cultures de cellules humaines permettant d'étudier la lymphopoïèse B. De manière intéressante, la dose la plus faible de TCDD utilisée est équivalente à ce que l'on a pu mesurer dans le sérum de personnes exposées après l'accident de Seveso (Italie – 1976), soit 1 nM. Dans le cas des personnes exposées, la dioxine cause une diminution significative de la lymphopoïèse B. Les auteurs n'ont toutefois pas analysé tous les stades de différenciation des CSH en lymphocytes B, ce qui aurait permis de déterminer l'impact du TCDD à tous les niveaux de la lymphopoïèse B. Il est intéressant de noter que d'autres dioxines testées sur les CSH ont un effet similaire au TCDD. Tous ces effets se font via le récepteur AHR et sont corrélés au degré d'affinité de la liaison de cette dioxine avec AHR. Les lymphocytes B ayant une demi-vie de trois à huit semaines, leur renouvellement doit se faire continuellement par les CSH. De ce fait, l'exposition au TCDD qui altère l'engagement des CSH dans la lymphopoïèse B, pourrait compromettre le renouvellement des lymphocytes B et donc l'immunité humorale. Cette étude devrait être complétée afin d'analyser l'effet de l'activation d'AHR par le TCDD, sur l'expression des gènes ainsi que les voies de signalisation impliquées dans ce défaut de différenciation des CSH en lymphocytes B.

La voie du récepteur aux xénobiotiques (AHR) / cytochrome P450 1A1 favorise l'expansion des cellules souches cancéreuses mammaires via l'inhibition de PTEN et l'activation de β -caténine et Akt.

Al-Dhfyhan A. (2017). Aryl hydrocarbon receptor/cytochrome P450 1A1 pathway mediates breast cancer stem cells expansion through PTEN inhibition and β -Catenin and Akt activation. *Mol Cancer*, vol.16(1): p.14.

Résumé

Les cellules souches cancéreuses mammaires (CSCM*) représentent une sous-population tumorale qui serait impliquée dans l'initiation, la progression et l'invasion tumorale. AHR jouerait un rôle dans l'expansion de ces CSCM, mais les mécanismes restent peu connus (7-8). Les auteurs de ces travaux étudient les effets biologiques de l'activation ou de l'inhibition d'AHR sur les CSCM *in vitro* et *in vivo*, et identifient des voies de signalisation impliquées dans ces effets. La technique de référence *in vitro*, dite de « mammosphères »*, qui permet de conserver les CSCM dans un état indifférencié est utilisée. Les auteurs identifient également des sous-populations de CSCM par la technique de FACS comme la population dite SP* et la population ALDH+*. La RT-PCR* permet de comparer le

niveau d'expression des ARN messagers de *CYP1A1* et *CYP1B1*, deux gènes cibles d'AHR, dans les CSCM non-adhérentes (ou mammosphères) et les cellules adhérentes issues de cinq lignées cellulaires de cancer du sein. Le niveau basal de ces gènes, particulièrement du cytochrome *CYP1A1*, est significativement plus élevé dans les mammosphères, sauf pour l'une des lignées (MDA-MB231). Les auteurs choisissent d'utiliser la lignée MCF-7, dont le niveau d'expression de *CYP1A1* dans les mammosphères est le plus élevé. Le traitement des cellules MCF-7 avec des agonistes d'AHR, tels que le TCDD ou le DMBA*, augmente de façon significative le nombre de mammosphères, de cellules ALDH+ et de cellules SP*. Ces effets sont bloqués par l'utilisation de l' α -NF, un antagoniste de la voie AHR/*CYP1A1* ou l'utilisation d'un shRNA (ARN anti-sens) dirigé contre AHR. *In vivo*, les auteurs utilisent un modèle murin de tumorigenèse inductible par le DMBA. Une analyse histopathologique des tissus des glandes mammaires des souris traitées au DMBA indique la présence de cellules tumorales prolifératives et une forte augmentation du niveau d'expression de *CYP1A1* et des marqueurs ALDH.

Les auteurs s'attachent à identifier des voies de signalisation impliquées dans la transmission de l'effet d'AHR, en utilisant différents inhibiteurs pharmacologiques. Ils montrent que l'augmentation du nombre de cellules ALDH+ induit par le TCDD, est inhibée en présence d'un inhibiteur de la voie WNT*. Cette voie WNT est confirmée à l'aide d'un effecteur de cette voie, la β -caténine, qui se relocalise dans le noyau en réponse au TCDD et au DMBA. L'inactivation d'AHR bloque la relocalisation de la β -caténine alors que l'inhibition de *CYP1A1* conduit à l'extinction de l'expression du gène. AHR est donc important pour l'activation de la voie WNT/ β -caténine, également importante pour le renouvellement des CSCM. Enfin les auteurs montrent que le TCDD et le DMBA conduisent à une extinction de l'expression de PTEN* et à une activation de la voie AKT/PI3K* aussi bien *in vitro* que *in vivo*. L'inhibition de la voie AHR/*CYP1A1* (en utilisant le α -NF ou un shRNA dirigé contre AHR) est testée sur la réponse à la doxorubicine*, un agent anti-cancéreux. Les auteurs montrent que l'inhibition d'AHR conduit à l'augmentation de la mort cellulaire en réponse à la doxorubicine avec un effet plus marqué dans les CSCM.

La modulation de la voie AHR/*CYP1A1* aurait un impact significatif dans le contrôle de la prolifération, du maintien et de la capacité de renouvellement des CSCM, via des mécanismes impliquant les voies WNT/ β -caténine et PTEN-PI3K/AKT. L'utilisation de l' α -NF permettrait d'augmenter la sensibilité des CSCM aux traitements anti-cancéreux.

Commentaire

L'intérêt de cet article repose sur la démonstration de l'importance de la signalisation AHR dans les CSCM. Elle fait suite à une étude précédente démontrant que le TCDD augmente la prolifération des CSCM, le nombre et la taille des mammosphères. Pour la première fois, la coopération entre AHR/*CYP1A1* et les voies de signalisation WNT/ β -caténine et PTEN-PI3K/AKT, connues pour leur rôle dans le contrôle de la prolifération, est mise en évidence dans les CSCM. Elles sont d'importance puisqu'elles montrent

comment l'activation d'AHR conduit à la propagation des CSCM. Cet état est notamment important pour la propagation des cancers mais aussi dans la récurrence et la résistance à certaines chimiothérapies. Les auteurs montrent ce dernier point en testant la sensibilité à la doxorubicine, un agent chimiothérapeutique couramment utilisée en clinique. Bien que les résultats *in vitro* soient fortement confortés par ceux obtenus *in vivo*, les auteurs ont confiné leur étude à une seule lignée cellulaire (MCF-7). Il serait souhaitable de confirmer ces résultats dans plusieurs lignées cellulaires et dans les tumeurs mammaires humaines. L'utilisation d'inhibiteurs chimiques (à une seule dose) pour perturber l'activité des voies AKT et WNT demande aussi des études complémentaires pour valider la spécificité de leur effet. L'étude suggère au final que l'exposition à la dioxine en favorisant la propagation des CSCM pourrait altérer la réponse à certains traitements chimio-thérapeutiques et, en ce sens, les voies WNT et AKT semblent des cibles thérapeutiques d'intérêt.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Comprendre comment le TCDD perturbe le fonctionnement de la cellule permettra de mieux évaluer les risques associés à la dioxine. Les articles sélectionnés nous permettent de mieux comprendre les effets liés à l'activation d'AHR par la dioxine TCDD dans les cellules souches normales et cancéreuses. L'article de Li et al. montre qu'une exposition à la dioxine altère l'engagement des CSH dans la différenciation en lymphocytes B et donc possiblement l'immunité humorale. L'article d'Al-Dhfyar et al. montre que l'activation de la voie AHR/CYP1A1, inducible par le TCDD, favorise la prolifération des cellules souches cancéreuses dans les cancers du sein et pourrait avoir un impact sur la chimiorésistance. Les deux études confirment la toxicité du TCDD et son impact délétère pour l'homme. Du fait de l'action persistante du TCDD sur AHR et ses conséquences biologiques sur les cellules souches, tant normales que cancéreuses, il paraît essentiel de mettre en place des actions pour limiter l'exposition à la dioxine, ainsi que des outils pour identifier les populations exposées (et leur niveau d'exposition). En effet, les deux études montrent que le taux d'exposition d'un individu à la dioxine pourrait être un facteur de risque de défaut d'immunité humorale et un facteur important dans la prise en charge globale des patients atteints de cancer du sein.

GENERAL CONCLUSION

Understanding how dioxin (TCDD) perturbs cell fate is a central question to comprehend the causal relationship between TCDD-exposure and the incidence of cancer or immune diseases. Two additional studies show that AHR play a central function in stem cells that may explain clinical features of patients exposed to dioxin. In normal hematopoietic stem cells activation of AHR by TCDD reduces their ability to differentiate into mature B lymphocyte which may be the underlying mechanism of immune diseases. In breast tumors, cancer stem cells activation of AHR by TCDD causes increased self-renewal of cancer stem cells and have an impact on chemoresistance. Both studies further reinforce the idea that TCDD exposure is detrimental to human health and demonstrate that TCDD alter the biology of normal and cancer stem cells.

Lexique

AHR : Récepteur aux hydrocarbures aromatiques. C'est un facteur de transcription activé par des ligands endogènes (produit par l'organisme) ou extracellulaires (polluants).

ALDH ou Aldéhyde deshydrogénase : l'activité de l'ALDH est importante dans les CSCM.

Alpha-naphtoflavone ou α -NF : Molécule chimique et ligand antagoniste du récepteur AHR.

CS ou Cellules souches: Cellules ayant pour caractéristique de pouvoir se renouveler à l'infini et de se différencier sous contrôle.

CSC ou Cellules souches cancéreuses: Cellules cancéreuses capable d'initier une tumeur, de lui permettre de progresser, de former des métastases et de résister aux thérapies anti-cancéreuses.

CSCM ou cellules souches cancéreuses mammaires: Cellules capables de survivre et de proliférer dans des milieux sans sérum, en condition non-adhérentes et former des mammosphères ou tumosphères reproduisant l'hétérogénéité phénotypique d'une tumeur.

CSH ou cellules souches hématopoïétiques : Sous-population de cellules donnant naissance à toutes les lignées du sang par un processus de différenciation qui s'accompagne de la perte des marques « souches », et de maintenir l'homéostasie cellulaire pendant la vie d'un individu. Cellules ayant la capacité d'auto-renouvellement et multipotentes.

CSPH ou cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques : Sous-population de cellules qui comportent des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques. Les progéniteurs sont des cellules déjà différenciées qui perdent leur capacité de multipotence et d'auto-renouvellement et qui vont donner naissance à des lignées sanguines distinctes : myéloïde ou lymphoïdes.

Cytokines : Molécules produites par des cellules du système immunitaire pour réguler l'activité ou la fonction d'autres cellules, dont la régulation de la différenciation des cellules lors de l'hématopoïèse.

DMBA : Diméthylbenzanthracène qui est un agent mutagène, couramment utilisé en recherche pour étudier le processus cancéreux. Il permet d'initier la formation de tumeurs. Ligand du récepteur AHR.

Doxorubicine : Composé anti-cancéreux utilisé dans le traitement du cancer du sein. Également appelé Adriamycine™.

FACS ou cytométrie en flux : Technique permettant de trier les cellules sur la base de caractères intrinsèques.

Immunité humorale : Immunité adaptative liée à la réponse immune due aux anticorps. Les lymphocytes B, après activation par un antigène, se transforment en plasmocytes produisant l'anticorps spécifique de l'antigène.

Lymphopoïèse B : Processus de différenciation des lymphocytes B à partir des CSH.

Mammosphères : Amas sphériques de cellules qui permet de maintenir en culture les CS du sein.

SP ou Side Population : Les CSC surexpriment des pompes transmembranaires qui permettent l'exclusion de diverses substances ayant pénétré dans la cellule. L'incubation de CSC avec des colorants vitaux permet de distinguer les CSC qui rejettent le colorant, population SP, des cellules différenciées qui conservent le colorant. La population SP peut alors être isolée par FACS. La population SP a des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation, caractéristique propre des cellules souches.

RT-PCR ou reverse transcription-polymerase chain reaction : Technique moléculaire d'analyse des ARN. Elle permet, en utilisant des amorces spécifiques, de mesurer le niveau d'expression d'un ARN.

shRNA ou ARN interférent : Acide ribonucléique (ARN) simple ou double brin dont l'interférence avec un ARN messager conduit à la dégradation de ce dernier ou à une diminution de sa traduction en protéine.

TCDD : Molécule de la famille des dioxines (2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine) considérée comme carcinogène pour l'homme. Ligand de AHR.

Voie de signalisation WNT/ β -caténine : Voie de signalisation qui permet le maintien, entre autre, de l'état indifférencié des cellules souches. Une protéine WNT se lie à un récepteur membranaire ce qui a pour effet de déplacer la β -caténine dans le noyau, où elle peut jouer son rôle de coactivateur de la transcription de certains gènes.

Voie de signalisation PTEN PI3K/AKT : PTEN est un régulateur négatif de la voie de signalisation PI3K/AKT. La perte de PTEN entraîne l'activation d'AKT qui induit la prolifération et permet la survie des cellules en inhibant l'apoptose.

Publications de référence

1 Dong Z, Liu Y, et al. Uncertainties in human health risk assessment of environmental contaminants: A review and perspective. *Environ Int.* 2015 Dec;85:120-32.

2 Chang ET, Boffetta P, et al. A critical review of the epidemiology of Agent Orange or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and lymphoid malignancies. *Ann Epidemiol.* 2015 Apr;25(4):275-292.

3 Floret N, Mauny F, et al. Dioxin emissions from a solid waste incinerator and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Epidemiology.* 2003 Jul;14(4):392-8.

4 Viel JF, Floret N, et al. Increased risk of non-Hodgkin lymphoma and serum organochlorine concentrations among neighbors of a municipal solid waste incinerator. *Environ Int.* 2011 Feb;37(2):449-53.

5 Boitano AE, Wang J, et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science.* 2010 Sep 10;329(5997):1345-8.

6 Landi MT, Bertazzi PA, et al. TCDD-mediated alterations in the AhR-dependent pathway in Seveso, Italy, 20 years after the accident. *Carcinogenesis.* 2003 Apr;24(4):673-80.

7 Brantley E, Callero MA, et al. AhR ligand Aminoflavone inhibits $\alpha 6$ -integrin expression and breast cancer sphere-initiating capacity. *Cancer Lett.* 2016 Jun 28;376(1):53-61.

8 Jung JW, Park SB, et al. Metformin represses self-renewal of the human breast carcinoma stem cells via inhibition of estrogen receptor-mediated OCT4 expression. *PLoS One.* 2011;6(11):e28068.

<https://www.anses.fr/fr/content/dioxines-et-aliments-lanses-fait-le-point>

Revue de la littérature

Tong Y, Niu M, et al. Aryl hydrocarbon receptor suppresses the osteogenesis of mesenchymal stem cells in collagen-induced arthritic mice through the inhibition of β -catenin. *Exp Cell Res.* 2017 Jan 15;350(2):349-357.

Bock KW. From dioxin toxicity to putative physiologic functions of the human Ah receptor in homeostasis of stem/progenitor cells. *Biochem Pharmacol.* 2017 Jan 1;123:1.

Ko CI, Fan Y, et al. Repression of the Aryl Hydrocarbon Receptor Is Required to Maintain Mitotic Progression and Prevent Loss of Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells.* 2016 Dec;34(12):2825-2839.

Kovalova N, Nault R, et al. Comparative analysis of TCDD-induced AhR-mediated gene expression in human, mouse and rat primary B cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017 Feb 1;316:95-106.

Fracchiolla NS, et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) role in hematopoiesis and in hematologic diseases: A critical review. *Toxicology.* 2016 Dec 30;374:60-68.

Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt.