



CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Fulton JF, Ranson SW, Frantz AM. *The hypothalamus and control levels of autonomic functions*. Baltimore, MD : Williams and Co, 1940.
2. Guillemin R. Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. *J Endocrinol* 2005 ; 184 : 11-28.
3. Cattanach BM, Iddon CA, Charlton HM, et al. Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature* 1977 ; 269 : 338-40.
4. Adelman JP, Mason AJ, Hayflick JS, et al. Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 179-83.
5. Cheng CK, Leung PC. Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev* 2005 ; 26 : 283-306.
6. Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, et al. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* 1986 ; 234 : 1366-71.
7. Charlton HM, Halpin DM, Iddon C, et al. The effects of daily administration of single and multiple injections of gonadotropin-releasing hormone on pituitary and gonadal function in the hypogonadal (hpg) mouse. *Endocrinology* 1983 ; 113 : 535-44.
8. Gill JC, Wadas B, Chen P, et al. The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal population is normal in size and distribution in GnRH-deficient and GnRH receptor-mutant hypogonadal mice. *Endocrinology* 2008 ; 149 : 4596-604.
9. Mason AJ, Pitts SL, Nikolics K, et al. The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy. *Science* 1986 ; 234 : 1372-8.
10. Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, et al. Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N Engl J Med* 2009 ; 360 : 2742-8.
11. Nikolics K, Mason AJ, Szönyi E, et al. A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. *Nature* 1985 ; 316 : 511-7.
12. Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, et al. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 11703-8.

NOUVELLE

P53, ARF et P16 : la ligne Maginot de la reprogrammation cellulaire

Marilyne Dijon-Grinand, John De Vos

Institut de recherche en biothérapie,
IRB, Inserm U847, Équipe développement embryonnaire
précoce et cellules souches, Hôpital Saint-Eloi,
80, avenue A. Fliche,
34295 Montpellier France.
john.devos@inserm.fr e-mail

► La technologie des cellules souches pluripotentes induites (iPS), une technique de reprogrammation cellulaire, vient de fêter ses trois ans au mois d'août [1]. On a de la peine à imaginer que cette approche qui a révolutionné le domaine des cellules souches soit si jeune ! La recette est simple : l'expression forcée des gènes *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* et *cMyc* par manipulation génétique ou par protéines recombinantes contraint une cellule différenciée tel un fibroblaste ou une cellule épithéliale à changer sa nature et à adopter un comportement de type cellule souche embryonnaire [2, 3]. C'est une technique parfaitement reproductible, ce qui explique sa diffusion dans les laboratoires. Cependant, on s'étonne que le pourcentage de cellules reprogrammées à chaque expérience soit si faible, de l'ordre de 0,05-0,5 % pour des fibroblastes embryonnaires de souris ou de 0,002-0,02 % pour des fibroblastes post-natals humains. Cette faible fréquence ne peut s'expliquer par la sélection de rares événements de muta-

genèse insertionnelle puisque l'on peut obtenir des iPS par vecteur épisomique ou par protéines recombinantes [3, 4], ni par le ciblage d'une sous-population mineure de cellules souches immatures, puisque la reprogrammation de lymphocytes B matures ayant recombiné le locus des immunoglobulines est possible [5]. Une série exceptionnelle de cinq articles publiés dans la revue *Nature* vient montrer qu'un frein majeur à la reprogrammation, qui explique en partie le faible pourcentage de cellules reprogrammées, est la voie anti-oncogénique faisant intervenir P53 et INK4a [6-10]. Le premier message de ces travaux est que le blocage de l'activité de P53 augmente considérablement le rendement de la reprogrammation : celui-ci atteint 80 % dans le contexte de la reprogrammation de fibroblastes murins embryonnaires (MEF) « secondaires » (c'est-à-dire issus eux-mêmes d'iPS primaires) par induction par la doxycycline des transgènes intégrés. Ces résultats sont transposables aux cellules humaines et l'efficacité

de la reprogrammation de fibroblastes est augmentée d'un facteur 10 [10]. Une telle amélioration de la technologie de reprogrammation ouvre naturellement de nouvelles portes, et, par exemple, le blocage de P53 permet de reprogrammer un certain nombre de types cellulaires réfractaires à la méthodologie « standard » comme les lymphocytes T [7] ou les fibroblastes issus de souris déficientes en télomérase *hTert*^{-/-} de troisième génération [10]. Il permet également de raccourcir de manière spectaculaire le temps pendant lequel la surexpression des facteurs de reprogrammation exogènes est requise, passant de 8 jours à 3 ou 4 jours pour des MEF [9], ou de reprogrammer sans vecteur intégratif des cellules jusqu'à maintenant résistantes à ce type de reprogrammation plus délicate [7]. Le blocage de la voie P53 ne doit pas être permanent : son inhibition transitoire par l'utilisation de shARN (*short hairpin*) ciblant P53 pendant la reprogrammation suffit tout comme son inhibition indirecte par l'intermédiaire de

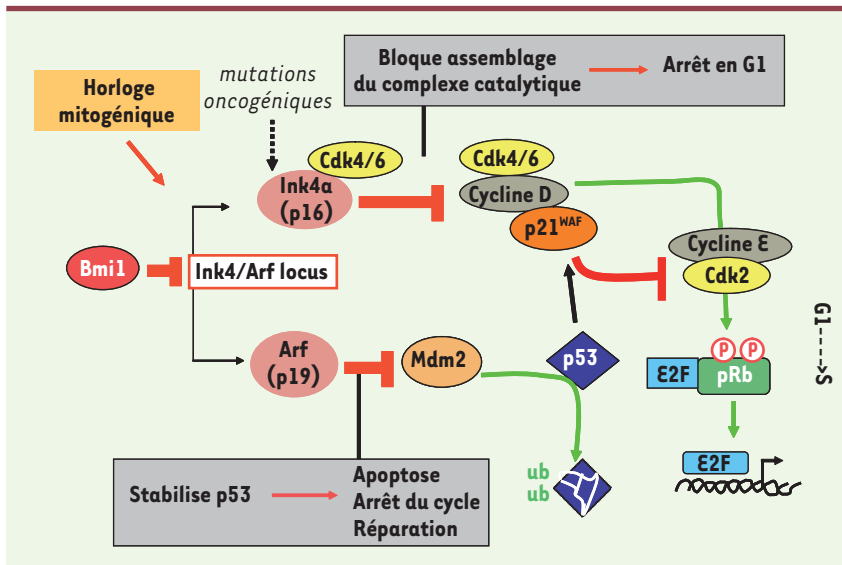


Figure 1. Principales fonctions des protéines codées par le locus *Ink4A/p16*.

par la propriété intrinsèque des cellules pluripotentes à proliférer et par le risque de sélection de clones génétiquement anormaux. Il serait donc dangereux, même dans le but légitime d'améliorer la technique de la reprogrammation, de se laisser tenter à manipuler les gardiens du génome dans le cadre de la production d'iPS thérapeutiques. ♦

P53, ARF and P16 : the last defence against reprogramming

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 ; 126 : 663-76.
2. Coulombel L. Reprogrammation nucléaire d'une cellule différenciée : on efface tout et on recommence. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 667-70.
3. De Vos J. Reprogrammation : les vecteurs ADN passent le relais aux protéines recombinantes. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 5 : 572.
4. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009 ; 324 : 797-801.
5. Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 2008 ; 133 : 250-64.
6. Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, et al. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 2009 ; 460 : 1140-4.
7. Hong H, K Takahashi, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 2009 ; 460 : 1132-5.
8. Li H, Collado M, Villasante A, et al. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* 2009 ; 460 : 1136-9.
9. Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, et al. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 2009 ; 460 : 1145-8.
10. Marión RM, Strati K, Li H, et al. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 2009 ; 460 : 1149-53.
11. Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, et al. Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 29 ; 383 : 157-62.

protéines impliquées dans sa régulation, telles que MDM2 ou ARF [6, 7, 9, 10].

Le deuxième fortin qui empêche une cellule différenciée de se reprogrammer est justement les protéines codées par le locus *Arf/Ink4a*. Ce locus est une énigme génétique puisqu'il code, par épissage alternatif et par utilisation de cadres de lectures différents de l'exon 2, deux protéines très différentes, ARF et INK4a/P16, mais qui contrôlent positivement l'activité des deux gènes suppresseurs de tumeurs majeurs que sont respectivement P53 et la protéine du rétinoblastome (Figure 1). Ce locus est une véritable ligne Maginot dans la réponse antitumorale. On vient de voir que l'inactivation de ARF augmente considérablement l'efficacité de reprogrammation, par son action sur la voie P53. De même, l'inactivation de P16 par shARN augmente l'efficacité de reprogrammation, et l'inactivation simultanée d'ARF et P16 est synergique, son effet facilitant étant supérieur à l'inhibition de ARF ou P53 seule [6, 8, 9]. Mais puisque P53 et ARF-INK4a sont les piliers antitumoraux de la cellule, leur inactivation reste une action très risquée. C'est donc peu surprenant que l'on constate une activation de la voie de réponse

aux dommages de l'ADN (DNA damage response, DDR) lorsque l'on bloque P53 au cours de la reprogrammation, avec accumulation de la forme phosphorylée du gène *Atm* (ataxia-telangiectasia-mutated), et accumulation de dommages ADN dont des fusions télomériques et des cassures chromosomiques [10].

À l'évidence, l'ensemble de ces observations construit des ponts entre le domaine des iPS et celui de la cancérologie. Dans les deux cas, p53 et le locus *Arf/Ink4a* sont des freins, frein à la dédifférenciation dans un cas, frein à la cancérisation dans l'autre. Un autre lien évident, et qui explique peut-être le premier point, est que la majorité des facteurs de reprogrammation (cMYC, OCT4, KLF4) sont des oncogènes ou sont surexprimés dans un grand nombre de cancers [11]. Il est tentant de faire un parallèle entre l'activation de la voie DDR observée au cours de la reprogrammation des fibroblastes p53^{-/-} et celle induite par la surexpression d'oncogènes [10]. Ces résultats sont un pas en avant considérable dans la compréhension des barrières qui contrôlent la dédifférenciation. Mais, à l'heure actuelle, l'un des principaux obstacles à l'utilisation en clinique des iPS est le risque de tumeur -