

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2014

THESES 2014 / TOU3 / 2079

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

GREGOIRE HELENE

COMPARAISON DE DEUX TYPES DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES :
EMBRYONNAIRES ET INDUITES.

Date de soutenance

Directeur de thèse : Couderc Bettina

JURY

Président : Couderc Bettina
1er assesseur : Taboulet, Florence
2ème assesseur : Parini Angelo
3ème assesseur : Petel Alain

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à ce projet. Je remercie tout particulièrement les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Un grand merci à ma directrice de thèse le Pr. Bettina Couderc de m'avoir fait connaître ces cellules au cours d'une soirée au Café Bioéthique Etudiant. Merci de m'avoir accompagnée et dirigée tout au long de ce travail qui m'a passionné.

Je remercie également le Pr. Angelo Parini, le Pr. Florence Taboulet et M. Alain Petel d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Un grand merci au Pr. Florence Taboulet d'avoir été là tout au long de ces six années d'études, de m'avoir permis d'apporter une petite aide au Café Bioéthique Etudiant et de m'avoir fait confiance pour exposer ses réflexions lors d'une conférence d'Arboris Scientae. Merci à Alain Petel pour les promenades dominicales à Balma, merci aussi de m'avoir permis de travailler dans votre pharmacie pour mon tout premier contrat en tant que pharmacien.

Je remercie énormément mes parents et mes sœurs, pour leur patience et leur amour depuis toujours. Merci de m'avoir soutenu tout au long de ces études, et merci à mes parents et à Estelle d'avoir pris le temps de corriger avec justesse ma thèse. Merci à mes grands-parents pour l'amour qu'ils me donnent sans compter. Merci à Marie qui veille si bien sur moi.

Merci à mes amies de pharmacie : Marie, Julie, Marine, Amélie, Charlotte, Anne, Faustine et Laurène pour votre joie, votre présence et tous ces moments partagés que je n'oublierai jamais. Merci à Célia, Bastien, Najib et Pol-André, les soirées salsa partagées avec vous me manqueront.

Merci à mes compagnes de révisions Raphaëlle, Clarisse et Fanny. C'est bien grâce à vous et à votre soutien que je suis arrivée là ! L'amitié que vous m'offrez est ce que j'ai de plus cher. Merci à Emilie pour ton écoute et ta compréhension, Marie-Elisabeth pour ta

solidarité et ton soutien, Marie-Eléonore pour toutes ces années, Samuel F. pour ta gentillesse. Merci à Yaëlle pour les fous rires, Mathilde et Philippe pour notre amitié d'Eyne à Toulouse en passant par Strasbourg, Samuel M. pour les riches conversations que nous avons eu et ton indéfectible amitié. Un grand merci à FX pour ton incomparable prévenance et ta présence et à Marie-Cécile de m'avoir donné ta si précieuse amitié depuis plus de vingt ans.

Merci à mes chères voisines Paula, Maya et Mme Amiel, j'étais vraiment chez moi ici.

Aujourd'hui je pars, mais je ne vous oublierai pas à l'autre bout du monde !

*« Sapience n'entre point en ame malivole,
et science sans conscience n'est que ruyne de l'ame. »*

Rabelais (Pantragrue, 1532)

Table des matières

TABLE DES MATIERES	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	11
PREMIER CHAPITRE : CELLULES SOUCHES ET PLURIPOTENCE	12
A. LES CELLULES SOUCHES.....	12
1) <i>Cellules souches : définitions</i>	12
a) Les deux caractéristiques principales de la cellule souche.....	12
b) Démontrer qu'une cellule est pluripotente	14
i. Chez la souris.....	14
ii. Chez l'homme.....	15
2) <i>Les différents types de cellules souches</i>	16
a) Les différents degrés de potence	16
b) Les cinq types de cellules pluripotentes.....	17
i. Les cellules embryonnaires de carcinome (ECC)	18
ii. Les cellules souches embryonnaires (ESC)	18
iii. Les cellules souches de l'épiblaste (EpiSC)	19
iv. Les cellules embryonnaires germinales (EGC)	19
v. Les cellules pluripotentes induites (iPSC)	19
B. LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES	20
1) <i>Induction expérimentale de la pluripotence</i>	20
a) La fusion cellulaire.....	21
b) Le transfert nucléaire somatique (SCNT)	22
c) La reprogrammation induite	23
d) La transdifférenciation intratissulaire	24
2) <i>Les cellules souches embryonnaires ES</i>	24
a) Origine des blastocystes.....	25
b) Isolement des cellules souches de l'ICM	26
c) Mise en culture des cellules ES humaines.....	27
d) Vérification de leur transformation effective.....	28
3) <i>Les cellules souches pluripotentes induites iPSC</i>	29
a) Choix des cellules reprogrammées.....	29
b) Choix des facteurs de reprogrammation.....	30
c) Choix de la méthode de vectorisation.....	33
i. Méthodes avec intégration	33
ii. Méthodes sans intégration.....	34
iii. Méthodes sans vecteurs.....	35
DEUXIEME CHAPITRE : COMPARAISONS ENTRE CELLULES ES ET CELLULES IPS	38
A. UTILISATION DES CELLULES SOUCHES.....	38
1) <i>Les cellules souches pluripotentes : un outil précieux pour la recherche</i>	38
a) La modélisation pathologique	39
b) Le screening	40
c) En toxicologie	41
2) <i>Les cellules souches pluripotentes, un outil en thérapie cellulaire et médecine régénératrice.</i>	41
a) Définitions	41
i. La thérapie cellulaire	42
ii. La médecine régénératrice.....	43
b) Les domaines d'application en thérapie cellulaire	44

i.	En neurologie	45
ii.	En ophtalmologie	49
iii.	En cardiologie	52
c)	Autres domaines d'application	56
B.	COMPARAISON ENTRE LES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES PLURIPOTENTES	61
1)	<i>Comparaison des sources de cellules souches pluripotentes</i>	<i>61</i>
2)	<i>Comparaison des pluripotences.....</i>	<i>62</i>
3)	<i>Comparaison de l'auto-renouvellement</i>	<i>65</i>
4)	<i>Comparaison de l'expression génique</i>	<i>65</i>
5)	<i>Comparaison de l'expression épigénétique</i>	<i>67</i>
6)	<i>Screening et modélisation</i>	<i>69</i>
7)	<i>Comparaison des coûts.....</i>	<i>70</i>
8)	<i>Comparaison des réponses immunologiques</i>	<i>70</i>
9)	<i>Réglementation</i>	<i>72</i>
10)	<i>Conclusion</i>	<i>76</i>
TROISIEME CHAPITRE :	REFLEXIONS BIOETHIQUES	78
A.	PROBLEMES ETHIQUES POSES PAR LES CELLULES ES HUMAINES	78
1)	<i>La nature de la cellule embryonnaire</i>	<i>79</i>
a)	<i>La cellule embryonnaire ne peut être amalgamée aux gamètes</i>	<i>79</i>
b)	<i>La cellule embryonnaire n'est pas un embryon</i>	<i>80</i>
2)	<i>Lever l'hypocrisie sur une pratique déjà répandue : l'incohérence de la loi</i>	<i>81</i>
3)	<i>Un encadrement rigoureux pour éviter tout abus</i>	<i>83</i>
4)	<i>La France a un fort retard à rattraper</i>	<i>85</i>
5)	<i>Une éthique qui suit l'évolution de la société</i>	<i>88</i>
a)	<i>L'eugénisme de la nature</i>	<i>88</i>
b)	<i>L'embryon : un donneur d'organe ?.....</i>	<i>89</i>
c)	<i>Moment où l'embryon acquiert une dignité.....</i>	<i>89</i>
6)	<i>Ethique et principes d'une bonne pratique</i>	<i>91</i>
a)	<i>Le rôle de l'éthique</i>	<i>91</i>
b)	<i>Les principes fondant la pratique médicale</i>	<i>91</i>
c)	<i>Le rapport bénéfice/risque</i>	<i>92</i>
d)	<i>Le principe de précaution.....</i>	<i>93</i>
B.	PROBLEMES ETHIQUES POSES PAR LES CELLULES IPS	95
1)	<i>Vie privée</i>	<i>95</i>
2)	<i>Consentement éclairé</i>	<i>95</i>
3)	<i>Innocuité et efficacité des traitements</i>	<i>96</i>
4)	<i>Potentialités.....</i>	<i>97</i>
C.	CONCLUSION.....	97
CONCLUSION	98	
BIBLIOGRAPHIE	99	
ANNEXES.....	109	

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES :

Figure 1 : Stades de développement de l'embryon	p. 12
Figure 2 : Tests évaluant la pluripotence, du moins rigoureux à gauche aux plus rigoureux à droite	p. 13
Figure 3 : Les différents types de cellules souches humaines, leurs origines et leur capacité de différenciation	p. 15
Figure 4 : Origine des différentes catégories de cellules souches pluripotentes	p. 16
Figure 5 : Stratégies de reprogrammation des cellules somatiques	p. 19
Figure 6 : La fusion cellulaire	p. 20
Figure 7 : Le transfert nucléaire somatique	p. 21
Figure 8 : La transduction de facteurs de transcription	p. 22
Figure 9 : Dérivation et propriétés biologiques des ESCh	p. 25
Figure 10 : Un rétrovirus	p. 32
Figure 11 : ADN chromosomique et plasmide	p. 34
Figure 12 : Récapitulatif des techniques de reprogrammation existantes	p. 36
Figure 13 : La démarche scientifique menant à la découverte de nouvelles thérapies	p. 37
Figure 14 : Les quatre sources de cellules souches	p. 41
Figure 15 : Recoupements entre médecine régénératrice et thérapie cellulaire	p. 42
Figure 16 : Les phases des essais cliniques	p. 43
Figure 17 : Différents niveaux des lésions vertébro-médullaires	p. 44
Figure 18 : Impact de la SLA sur les neurones et sur les muscles	p. 46
Figure 19 : L'œil	p. 48
Figure 20 : La morphologie du cœur est modifiée par rapport à la normale lorsqu'il est en situation d'insuffisance cardiaque	p. 51
Figure 21 : Structure du pancréas	p. 55

Figure 22 : Construction d'un épiderme pluristratifié fonctionnel à partir de kératinocytes dérivés de hESC in vitro et in vivo	p. 56
Figure 23 : Les différentes régions du cerveau	p. 58
Figure 24 : Utilisation des embryons créés dans le cadre d'une FIV	p. 61
Figure 25 : La reprogrammation incomplète des cellules iPS	p. 63
Figure 26 : Chevauchement des variations existantes entre ESC et iPSC	p. 65
Figure 27 : Mémoire épigénétique de cellules iPS	p. 67
Figure 28 : Les trois problèmes éthiques soulevés par les cellules embryonnaires humaines	p. 77
Figure 29 : Les différentes raisons du retard de la France dans le développement de la thérapie cellulaire	p. 84

TABLEAUX :

Tableau I : Avantages et inconvénients des techniques utilisées pour le passage des ESCh	p. 27
Tableau II : Molécules favorisant la reprogrammation en cellules iPS	p. 31
Tableau III : Tableau récapitulatif des principales méthodes de reprogrammation	p. 32
Tableau IV : Exemples non exhaustifs de voies de différenciation explorées à l'aide des hESC et iPSC	p. 38
Tableau V : Banques et registres de cellules souches existants	p. 40
Tableau VI : Différents critères utilisés pour juger de la pluripotence d'une cellule	p. 62
Tableau VII : Nombre de clones ESC et iPSC analysés dans les publications	p. 64
Tableau VIII : Comparaison entre cellules ES et cellules iPS	p. 75

LISTE DES ABREVIATIONS

ABM : agence de la biomédecine

ACT : advanced cell technology

AMP : aide médicale à la procréation

ANSM : agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

bFGF : basic fibroblast growth factor

BPF : bonnes pratiques de fabrication

CBE : convention sur le brevet européen

CPP : cell penetrating peptide

CECOS : centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme

cellules ES humaines : cellules souches embryonnaires humaines

CNRS : comité national de la recherche scientifique

ESC : cellule souche embryonnaire

CSH : cellule souche hématopoïétique

CSM : cellule souche mésenchymateuse

DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge

DPI : diagnostic préimplantatoire

ECC : cellule embryonnaire carcinomique

EGC : cellule embryonnaire germinale

EpiSC : cellule souche épiblastique

EPR : épithélium pigmentaire de la rétine

ETDRS : early treatment diabetic retinopathy study

FIV : fécondation in vitro

FISH : fluorescence in situ hybridization

FDA : food and drug administration

GEE : groupement européen d'éthique des sciences et des nouvelles technologies

ICM : masse cellulaire interne

iPSC : cellule souche pluripotente induite

Inserm : Institut national de la santé et de la recherche médicale

hESC : cellule souche embryonnaire humaine

LIF : leukemia inhibitory factor

mESC : cellule souche embryonnaire murine

MEF : fibroblastes fœtaux murins (mouse embryonic fibroblasts)

MMLV : murine Malloney leukemia Virus

OCDE : organisation de coopération et de développement économiques

PCR : polymerase chain reaction

PGC : cellule germinale primordiale

RT : reverse transcriptase

SCNT : transfert nucléaire somatique

SCI : spinal cord injury, lésion de la moelle épinière

SLA : sclérose latérale amyotrophique

INTRODUCTION

En 2006, une prouesse scientifique révolutionna le monde scientifique : le biologiste Shinya Yamanaka, s'appuyant sur les travaux antérieurs de John Gurdon, réussit à faire « rajeunir » des cellules matures, donc différenciées, en cellules souches indifférenciées. On n'imaginait pas alors qu'une telle plasticité puisse exister chez les cellules adultes, et qu'une simple reprogrammation suffise à obtenir des cellules ressemblant à s'y méprendre aux cellules souches embryonnaires, pouvant se multiplier à l'infini et pouvant se différencier en n'importe quel autre type de cellule. Ces cellules, nommées cellules iPS pour cellules souches pluripotentes induites, allaient peut-être pouvoir se substituer aux cellules souches embryonnaires (ES), qui présentaient quelques inconvénients comme le rejet immunologique et les problèmes éthiques.

Mais l'enthousiasme de certains fut modéré par d'autres scientifiques, arguant que ces cellules iPS déclenchaient aussi une réponse immunologique, et que le risque de formation de tumeur était bien plus élevé qu'avec les cellules embryonnaires, à cause d'une reprogrammation incomplète.

Qu'en est-il vraiment ? Les cellules iPS sont-elles vraiment équivalentes aux cellules ES ? Pour répondre à cette question, nous allons dans un premier temps définir ce qu'est une cellule souche, à quoi correspond le terme de pluripotence, et comment procéder pour obtenir des cellules ES et iPS. Puis nous comparerons ces deux types de cellules : en s'informant des essais cliniques en cours aujourd'hui ainsi qu'en listant les points communs et les différences qui les distinguent. Nous finirons par aborder les problèmes éthiques soulevés par ces deux types de cellules en apportant un éclairage tant législatif que philosophique sur cette épineuse question.

Premier Chapitre : Cellules souches et pluripotence

A. Les cellules souches

Les cellules souches sont des cellules fascinantes, possédant des propriétés les rendant tellement intéressantes pour des applications thérapeutiques. Toutefois, le terme de cellule souche rassemble une grande variété de cellules aux potentiels divers. Nous nous pencherons tout d'abord sur la définition de cellules souches et les différents types de cellules que cela englobe. Puis nous étudierons les différentes techniques permettant d'obtenir des cellules pluripotentes, en s'arrêtant en particulier sur les cellules souches embryonnaires (ES) et sur les cellules souches pluripotentes induites (iPS).

1) Cellules souches : définitions

Une cellule souche est à la base de la constitution d'un organisme, puisqu'elles ont la capacité à la fois de se multiplier en très grande quantité et de se différencier en n'importe quel type de cellule spécialisée (ce qu'on appelle la pluripotence) : cardiaques, pulmonaires, hépatiques...

a) Les deux caractéristiques principales de la cellule souche

Contrairement aux cellules différenciées, les cellules souches sont par définition des cellules indifférenciées. Pour autant, elles ne sont pas reconnaissables sur des critères morphologiques. Certains, comme Rochon, Frouin et al (2006) ont pourtant bien tenté de comparer différents types de cellules souches en étudiant leur transcriptome (l'ensemble de leurs ARN issus de la transcription du génome), mais aucun marqueur de « souchitude » commun n'a été identifié (Denis, 2011). Comment déterminer alors si une cellule candidate peut être appelée « cellule souche » ?

Ceci ne peut se faire qu'en suscitant l'expression de leur fonction. En effet, les cellules souches se distinguent des autres cellules par deux fonctions essentielles. La capacité de *différenciation* tout d'abord, qui est la capacité à se différencier en cellules constituant les tissus dérivés des trois feuillettes primaires formés au cours de la gastrulation (endoderme,

ectoderme et mésoderme), ainsi qu'en cellules des lignées germinales. La deuxième caractéristique est l'*auto-renouvellement*, c'est-à-dire la capacité de se diviser à l'infini in vitro de façon physiologique, et non pathologique comme c'est le cas pour les cellules cancéreuses. In vivo, se diviser « à l'infini » signifie un très grand nombre de fois puisqu'en réponse à l'induction de l'environnement, les cellules souches s'engagent assez rapidement vers un processus de différenciation (Coulombel, 2007). Ces cellules se multiplient donc à l'identique, en conservant leur propriété de pluripotence.

Avant de continuer, rappelons que la fécondation d'un spermatozoïde et d'un ovule donne naissance à un œuf, ou zygote (figure 1). Ce zygote va subir des divisions successives en 2, 4, 8 cellules ou blastomères... le stade morula correspond à une trentaine de blastomères. Les divisions se poursuivant, on arrive en moins de 7 jours à un embryon au stade blastocyste, alors prêt à s'implanter dans la muqueuse utérine. Le blastocyste est constitué de trois parties :

- le trophoblaste périphérique qui donnera le placenta reliant l'embryon à l'utérus maternel,
- une grande cavité remplie de liquide, le blastocèle, qui disparaîtra progressivement au cours du développement embryonnaire,
- et la masse cellulaire interne (ICM) ou bouton embryonnaire, à partir duquel on obtient des cellules ES capables de donner à elles seules un organisme entier.

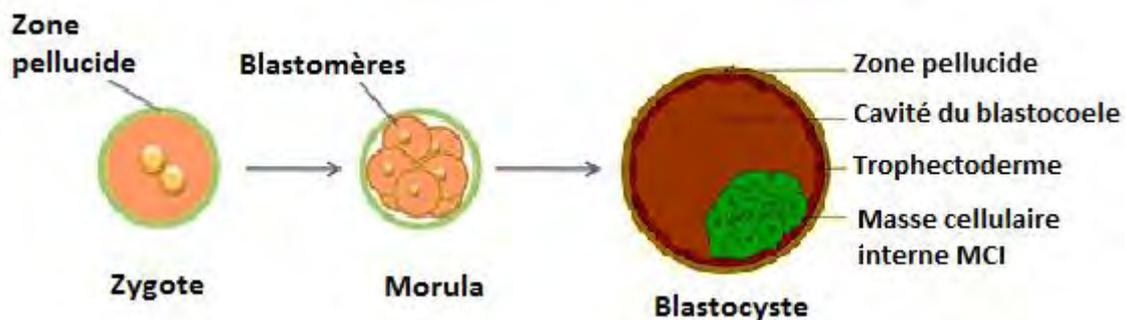


Figure 1 : Stades de développement de l'embryon

b) Démontrer qu'une cellule est pluripotente

i. Chez la souris

Afin de démontrer la pluripotence des cellules candidates, et donc leur capacité à l'auto-renouvellement tout comme à la différenciation, plusieurs expériences sont utilisées (figure 2). Les cinq critères démontrant une pluripotence sont :

- la formation de chimères avec transmission germinale chez la souris,
- l'expression de marqueurs,
- la capacité de différenciation *in vitro* : des corps embryoïdes peuvent être formés en suspension puis se différencier dans les lignages issus des trois feuillettes embryonnaires,
- la formation de tératomes *in vivo*, lorsque l'on injecte des cellules souches à des souris immunodéficientes,
- et la complémentation d'embryons tétraploïdes, c'est-à-dire que lorsqu'on les injecte dans un blastocyste, il se forme un embryon totalement issu de ces cellules souches (E.Kieffer et al, 2010)

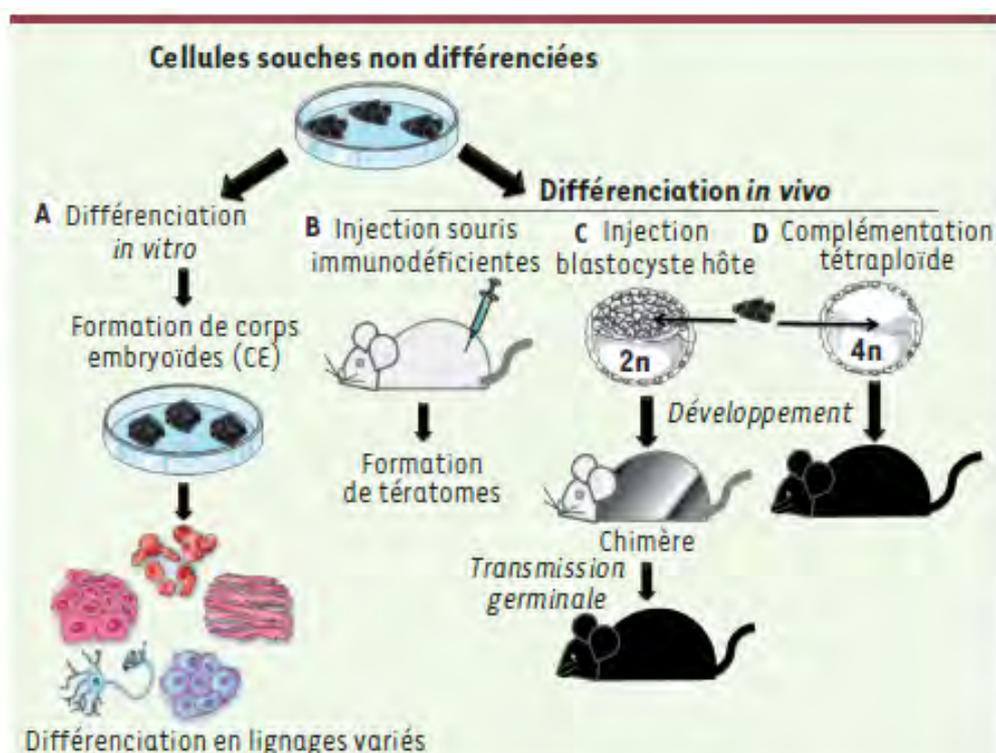


Figure 2 : Tests évaluant la pluripotence, du moins rigoureux à gauche aux plus rigoureux à droite (E.Kieffer et al, 2010). A-Différenciation *in vitro* B-Formation de tératomes *in vivo* C-Formation de chimères avec transmission germinale D- Complémentation d'un blastocyste tétraploïde.

Mais il est primordial pour évaluer la même pluripotence au sein des différents laboratoires d'avoir un critère de référence. Ce critère minimal requis pour qualifier une lignée de pluripotente est la formation de chimères (organismes possédant des cellules d'origines génétiques différentes) avec transmission germinale chez la souris. C'est le cas uniquement pour les cellules souches embryonnaires (ES) et pour les cellules souches pluripotentes induites (iPS) aujourd'hui. Leur pluripotence représente un immense intérêt que nous verrons par la suite (E.Kieffer et al, 2010).

ii. Chez l'homme

Autorenouvellement et différenciation des cellules souches sont ainsi démontrés dans le cas de cellules murines (le terme murin signifie « de souris »), mais cette preuve n'existe pas pour les cellules souches humaines (Coulombel, 2007). Un chimérisme expérimental chez l'Homme étant évidemment impossible à prouver, la pluripotence ne peut être clairement démontrée, mais plutôt suspectée sur un faisceau d'arguments basés sur quelques expériences voulant se rapprocher de l'organisme humain *in vivo*. Malgré cela, on se heurte chez l'homme à deux principaux obstacles ; premièrement celui de recréer les conditions existant dans un organisme humain : suivre le fonctionnement des CS *in vivo* n'est possible qu'après leur greffe chez l'animal, le plus souvent à court terme dans des souris immunodéficientes pour qu'elles tolèrent les xénogreffes (greffe où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur), donc toute extrapolation à l'organisme humain doit être faite avec prudence. Deuxièmement, celui du temps puisque cela prend plusieurs mois, voire plusieurs années pour qu'une CS soit autonome, un délai qui ne peut pas être obtenu chez la souris de moins de 20 semaines), ni *in vitro* à cause de la dégradation progressive des ingrédients de la culture (L.Coulombel, 2010).

Pourtant, bien qu'il soit difficile de démontrer la pluripotence de cellules *in vivo*, on sait déjà où chercher ces cellules souches chez un adulte. En effet, elles sont localisées dans des régions précises, les « niches », présentes dans les tissus à régénération rapide. Ces niches sont composées de cellules souches, ainsi que d'un environnement riche en facteurs et molécules servant à maintenir leur état indifférencié. Il existe par exemple des niches dans la moelle osseuse, dans le follicule pileux ou à la base des villosités de l'intestin (J.Denis, 2011).

On comprend, en observant la complexité de ce micro-environnement, pourquoi il est si difficile de maintenir ces cellules souches en culture *in vitro*.

2) Les différents types de cellules souches

a) Les différents degrés de potence

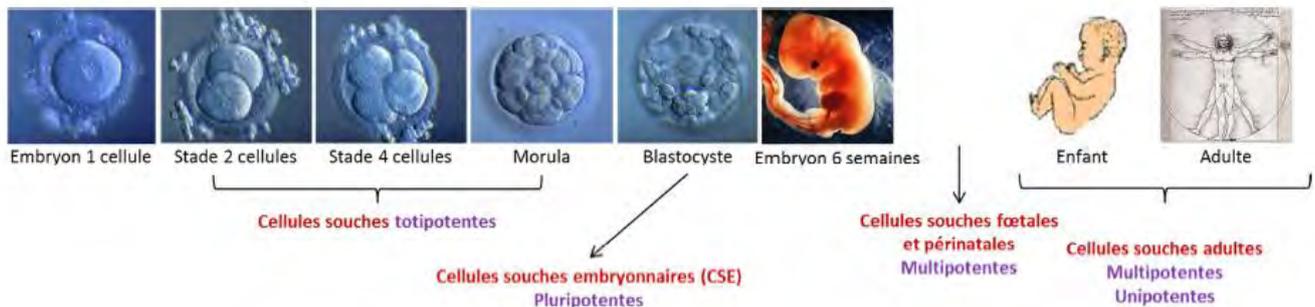


Figure 3 : Les différents types de cellules souches humaines, leurs origines et leur capacité de différenciation (J.Brault, 2013).

Après avoir distingué les cellules souches des cellules différenciées, nous allons maintenant voir les différents types existants au sein des cellules souches (figure 3). Nous distinguons quatre degrés de potence : l'unipotence, où les cellules ne se différencient qu'en un seul type de cellules spécialisées ; la multipotence, où une cellule ne produit que les types de cellules différenciées composant un seul tissu ; la pluripotence, où la cellule peut se différencier dans les trois lignages embryonnaires (endoderme, ectoderme, mésoderme) y compris germinales ; et la totipotence, à laquelle il faut y ajouter aux trois lignages embryonnaires le lignage trophoblastique placentaire (l'annexe extra-embryonnaire). Ce stade totipotent n'est conservé que jusqu'au stade de huit cellules, c'est-à-dire jusqu'au 4ème jour environ du développement embryonnaire (Coulombel, 2010).

Pour ne citer que les principaux exemples, les cellules souches de l'épiderme ne produisant que des kératinocytes sont unipotentes. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH), elles, sont multipotentes, on les retrouve dans les niches de la moelle osseuse, ou bien dans le sang de cordon ombilical ou le sang des adultes (Sawadogo, 2010). Elles produiront toutes les cellules de la lignée sanguine : hématies, lymphocytes, etc... Elles sont les cellules souches adultes les plus utilisées, car faciles d'accès et faciles à caractériser. D'autres cellules souches adultes existent, mais leur intérêt en médecine régénérative semble compromis, par exemple les cellules souches de système nerveux proliférant sous forme de « neurosphères » ex vivo, les cellules souches cardiaques et les cellules souches mésenchymateuses (CSM) proliférant sous forme d'ostéoblastes (fabriquant la matrice osseuse), de chondroblastes (fabriquant le cartilage) et d'adipocytes (accumulant des lipides). Dans ces trois cas, leur

différenciation in vivo ne semble pas possible notamment à cause de la complexité des organes (cerveau, cœur, tissus mésenchymateux) (L.Coulombel, 2010). Concernant les cellules pluripotentes, il en existe cinq types, mais seuls deux types sont réellement intéressants pour nous aujourd'hui : les cellules souches ES et les cellules iPS que nous étudierons en détail par la suite.

b) Les cinq types de cellules pluripotentes

Nous nous attarderons un peu plus sur les cellules pluripotentes puisque ce sont bien elles qui nous intéressent ici. On comprend bien qu'on ne retrouve cette capacité de différenciation presque illimitée uniquement dans les cellules embryonnaires puisque que chez le fœtus et l'adulte, les organes sont déjà formés. Nous connaissons aujourd'hui cinq types de cellules pluripotentes (figure 4) : quatre d'origine embryonnaire et un issu de la reprogrammation, technique modifiant l'expression des gènes donc l'état d'une cellule.

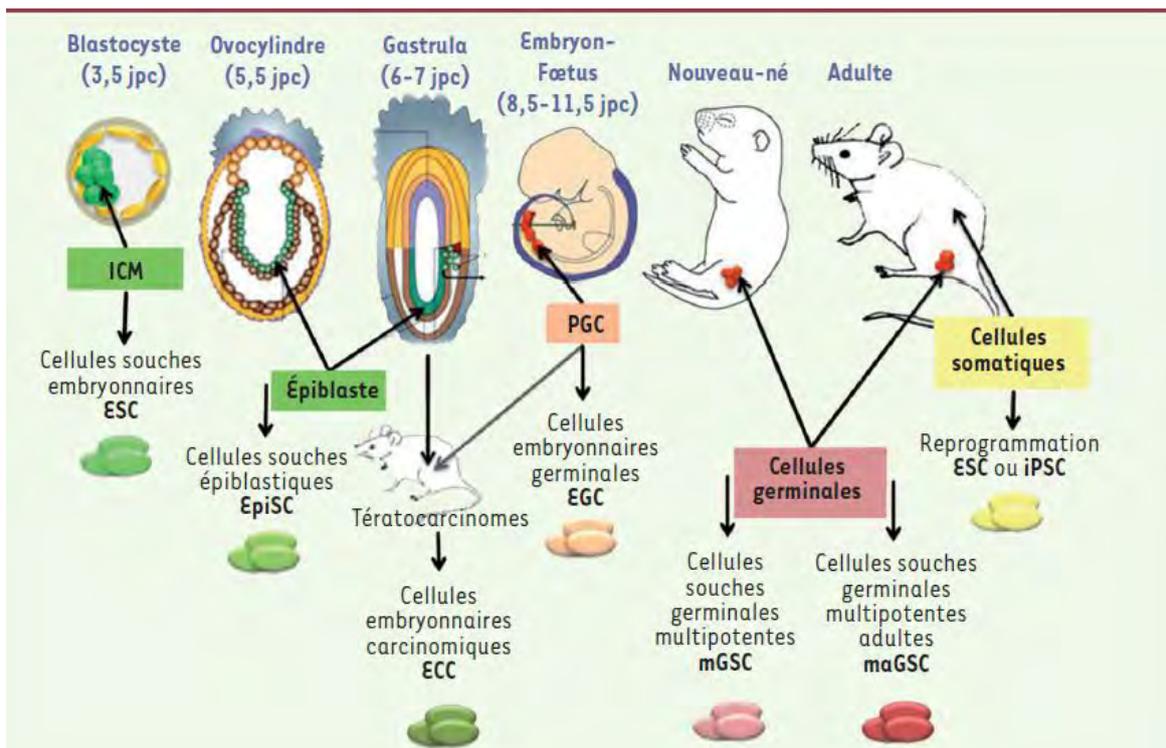


Figure 4 : Origine des différentes catégories de cellules souches pluripotentes (E.Kieffer et al. 2010). Les cellules souches pluripotentes peuvent dériver de différents stades de développement et à partir de différents tissus pluripotents. Notons l'ICM à partir duquel dérivent les cellules ES, et l'épiblaste dont dérivent directement les EpiSC ou, indirectement par la formation de tératocarcinome, des ECC (cellules embryonnaires carcinomiques). Les PGC (primordial germ cells) du fœtus permettent l'obtention des EGC (embryonic germinal cells), tandis qu'on obtient des cellules germinales du nouveau-né les mGSM (multipotent germ stem cells) et de l'adulte les maGSC (multipotent adult germ stem cells). Des cellules pluripotentes peuvent également être générées après reprogrammation de cellules somatiques (ESC ou iPS).

i. Les cellules embryonnaires de carcinome (ECC)

Historiquement, des cellules indifférenciées ont été observées dès 1964 à partir de cellules tumorales se développant dans les gonades et donnant tous types de cellules (muscle, cartilage, tissu neural). La recherche débuta vraiment dans les années 1970 quand il fut possible d'induire des tératocarcinomes, et d'obtenir ainsi ce qu'on nomma les cellules embryonnaires carcinomiques (ECC), cellules pluripotentes. Bien que leur utilisation fut minime, l'étude de ces cellules fut déterminante puisqu'elle démontra la nécessité d'une co-culture avec des cellules nourricières (ou feeders), les fibroblastes, pour leur maintien à l'état indifférencié (E. Kieffer, 2010).

ii. Les cellules souches embryonnaires (ESC)

Puis dix ans plus tard, en 1981, naquit la première génération des cellules embryonnaires murines (mESC), obtenue sans passer par la formation de tératocarcinomes. On obtient les mESC à partir d'embryons juste avant qu'ils ne s'implantent dans la muqueuse utérine, et plus précisément à partir du bouton embryonnaire ou ICM, entre les 5 jours $\frac{1}{2}$ et 7 jours $\frac{1}{2}$ après la fécondation en moyenne (Evans et Kaufman, 1981 ; Martin, 1981). Ces mESC, au potentiel de pluripotence bien plus large que celui des ECC, ont permis de générer de multiples modèles de souris mutantes et de déterminer plus précisément les conditions de cultures nécessaires pour maintenir une pluripotence à long terme (Smith et al, 1988). Il a ainsi été déterminé que la présence du facteur LIF (Leukemia inhibitory factor) maintient l'état indifférencié des mESC. C'est en 1998 qu'apparurent les premières générations de ESC humaines (hESC) et la détermination de leurs facteurs d'auto-renouvellement. Les mESC ont besoin du facteur LIF tandis que les hESC ont besoin du facteur bFGF (basic fibroblast growth factor) et de la voie activine/nodal (Thompson et al, 1998). Ce passage à l'expérimentation humaine n'est pas anodin : les premières lois de Bioéthique en 1994 puis celles de 2004 et 2011 en ont restreint l'utilisation par une dérogation accordée pour 5 ans. Mais depuis juillet 2013 (vote du Parlement modifiant la loi n°2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la Bioéthique), l'interdiction d'expérimentation avec dérogation est passée à l'autorisation encadrée.

iii. Les cellules souches de l'épiblaste (EpiSC)

L'embryon s'implante donc dans la muqueuse utérine. L'épiblaste est alors pluripotent, jusqu'au stade de la gastrulation. On peut en isoler des cellules ayant des caractéristiques très proches de celles des hESC : les cellules souches épiblastiques (EpiSC) (Teasler et al, 2007 ; Rossant, 2008). Ces ressemblances entre hESC et EpiSC (leur dépendance à bFGF et non à LIF, et leur morphologie) ont fait naître l'hypothèse que les hESC seraient en réalité issues de l'épiblaste, ce qui expliquerait les nombreuses différences observées entre les hESC et les mESC (E. Kieffer, 2010).

iv. Les cellules embryonnaires germinales (EGC)

Enfin, l'embryon subit la gastrulation. A ce stade, seules les cellules germinales primordiales (PGC) conservent des caractéristiques de pluripotence. Ces PGC sont des précurseurs des ovocytes et des spermatocytes prélevés sur les crêtes génitales de fœtus humains avortés entre la cinquième et la neuvième semaine de développement (Shamblott, Axelman et al., 1998). C'est de là que sont issues les cellules embryonnaires germinales (EGC), chez l'Homme comme chez la souris. Ce potentiel de pluripotence, variant en fonction des PGC originelles, persiste jusqu'au stade de nouveau-né, puisqu'on a pu obtenir des cellules souches germinales pluripotentes à partir de testicules (Guan et al, 2006).

v. Les cellules pluripotentes induites (iPSC)

C'est en combinant les connaissances acquises sur les cellules souches pluripotentes et celles sur les techniques de reprogrammation nucléaire (que l'on verra par la suite) que Takahashi et Yamanaka réussirent en 2006 à reprogrammer des fibroblastes fœtaux (MEF, mouse embryonic fibroblasts) et adultes de souris en cellules pluripotentes. Ce fut une véritable révolution : on avait réussi à faire « rajeunir » des cellules différenciées en cellules indifférenciées ! Nous verrons par la suite plus en détail les caractéristiques de ces cellules iPSC.

B. Les cellules souches pluripotentes

1) Induction expérimentale de la pluripotence

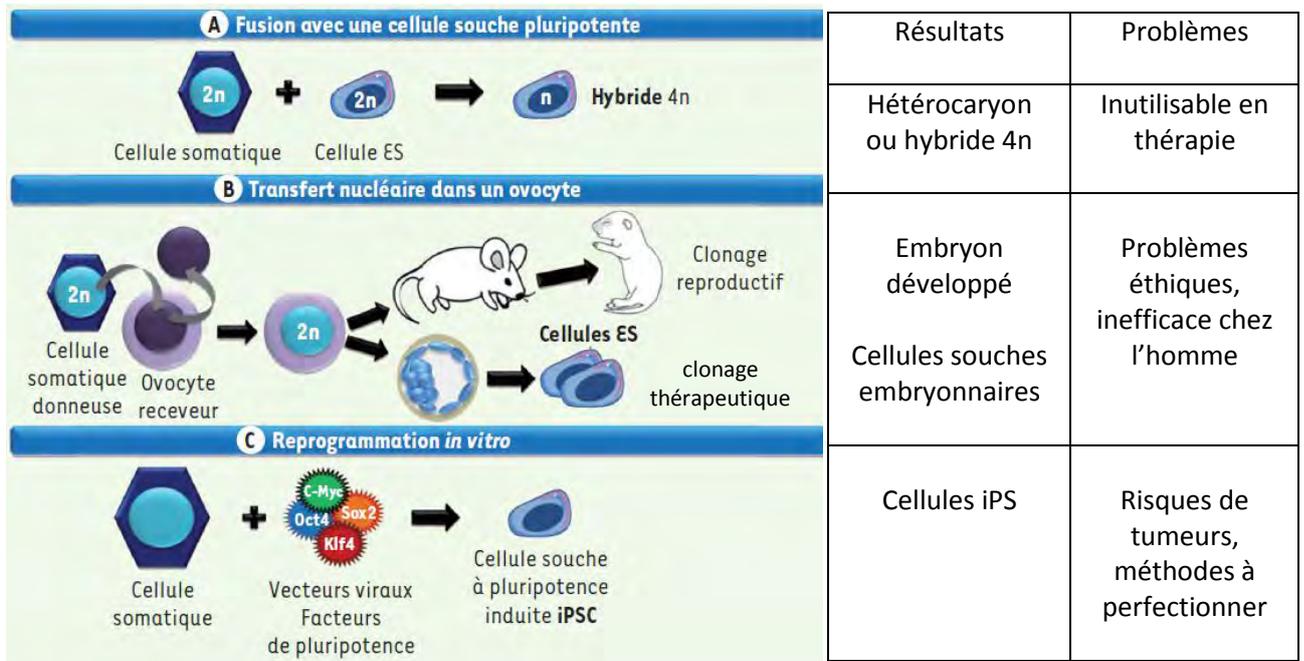


Figure 5 : Stratégies de reprogrammation des cellules somatiques (E.Kieffer et al. 2010)

Il existe trois principales méthodes permettant d'obtenir des cellules pluripotentes à partir de cellules somatiques.

A) en fusionnant 2 cellules : l'une somatique et l'autre souche pluripotente. On obtient ainsi soit un hétérocaryon (plusieurs noyaux distincts), soit après réplication un hybride n'ayant qu'un noyau tétraploïde 4n, possédant les caractéristiques d'une cellule pluripotente.

B) en transfusant le noyau d'une cellule somatique (2n, diploïde) dans un ovocyte préalablement énucléé. L'ovocyte reprogramme le noyau : on obtient ainsi un blastocyste 2n, et donc des cellules ES portant le matériel génétique de la cellule somatique donneuse. En laissant l'embryon se développer à son terme, il s'agit de clonage reproductif, bien sûr totalement interdit chez l'homme.

C) par transduction de facteurs de transcription. A partir de n'importe quelle cellule différenciée du corps, l'introduction de 4 gènes Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc induit ces cellules à la pluripotence (iPS, cellules souches pluripotentes induites), avec des caractéristiques très semblables à celles des cellules ES.

a) La fusion cellulaire

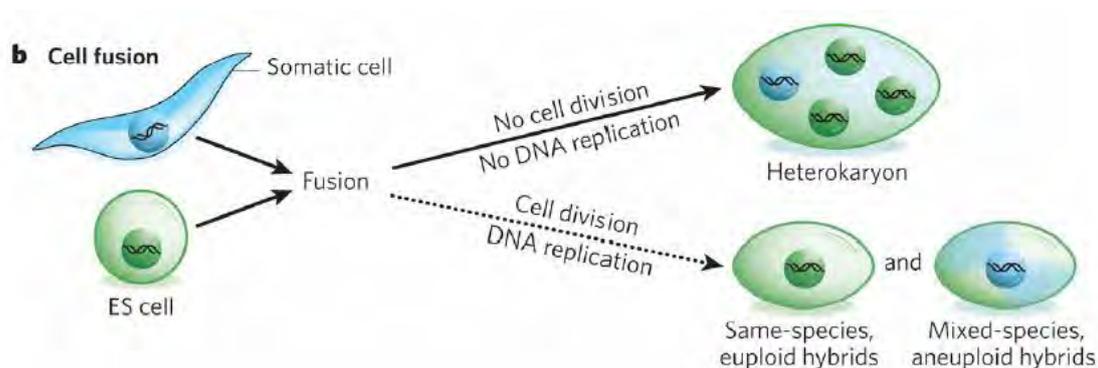


Figure 6 : La fusion cellulaire (Yamanaka et Blau, 2010)

Fusionner deux types cellulaires ou plus pour obtenir une seule entité permet de reprogrammer facilement des cellules à un état pluripotent (figure 6). Des cellules somatiques furent d'abord fusionnées avec des cellules embryonnaires de carcinome (Miller et al. 1976), puis avec des cellules ES murines (Tada et al. 2001) et enfin humaines (Cowan et al. 2005). Elles donnaient alors naissance soit à un hétérocaryon ayant plusieurs noyaux distincts qui n'ont pas fusionnés, soit à une cellule hybride tétraploïde (ayant $4n$ chromosomes, soit le double de la normale) après fusion des noyaux. Les hétérocaryons ont une durée de vie courte tandis que les cellules hybrides prolifèrent puisque leurs noyaux fusionnent, entrent en division et leur ADN se réplique, comme des cellules normales à $2n$.

Si les deux cellules fusionnées sont de la même espèce, le caryotype de l'hybride résultant sera euploïde (qui possède un nombre normal de chromosomes). Mais si les cellules sont d'espèces différentes, cela donnera naissance à une cellule aneuploïde. Une cellule aneuploïde possède un nombre anormal de chromosomes : un surnombre (trisomie, tétrasomie), un manque d'un des chromosomes homologues (monosomie) ou un manque de la paire entière (nullisomie).

Cette méthode n'a aucune application thérapeutique puisque les cellules hybrides, tétraploïdes, contiennent encore les chromosomes de la cellule ES, d'où un rejet lors d'une éventuelle transplantation. Toutefois, cette expérience montra qu'un état pluripotent pouvait dominer sur un état différencié dans certaines conditions. Cette observation permit de mettre en évidence qu'un gène jusqu'alors silencieux s'était réactivé : le gène Oct4, gène de la pluripotence. On remarqua aussi certains mécanismes moléculaires et modifications épigénétiques dirigeant la reprogrammation (Yamanka et Blau, 2010).

b) Le transfert nucléaire somatique (SCNT)

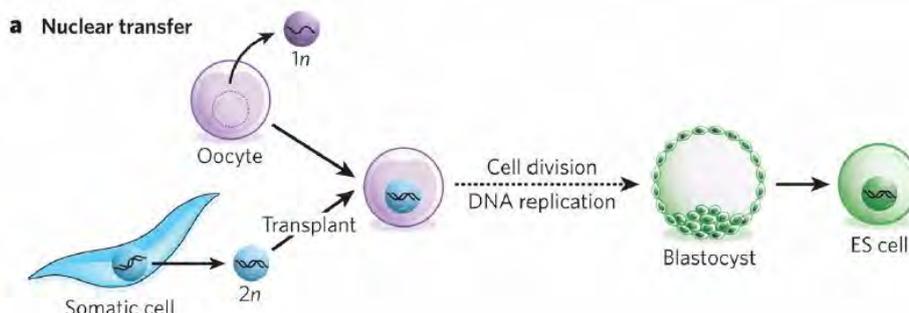


Figure 7 : Le transfert nucléaire somatique (Yamanaka et Blau, 2010)

Le procédé de transfert nucléaire de cellule somatique (SCNT, somatic cell nuclear transfer, figure 7), encore appelé « clonage », a prouvé que la spécialisation des cellules n'entraîne pas une perte ou un *silencing* permanent des gènes. C'est bien dès 1952 que King et Briggs implantèrent des noyaux issus de blastocystes de têtards dans des oocytes (œufs non fertilisés) énucléés (King et Briggs, 1952); ils démontrèrent ainsi le potentiel « développemental » du noyau d'une cellule. Mais c'est en 1962 que fut posé véritablement la technique du transfert nucléaire, lorsque Gurdon et al. réussirent l'exploit avec le noyau de cellules intestinales de grenouilles xénope, cellules bien plus spécialisées que celles des blastocystes de King et Briggs. (Gurdon, Elsdale et al. 1962) L'efficacité était très faible (environ 1%), mais cela démontrait de façon certaine que la différenciation n'était pas irréversible. L'autre inconvénient majeur fut que l'expérience ne pouvait pas être transposée aux autres espèces.

Ce n'est que 30 ans plus tard, en 1997, que Wilmut et al. réussirent avec succès le transfert nucléaire chez le mammifère : c'est la naissance de la fameuse brebis Dolly, obtenue par transfert du noyau de cellules folliculaires dans des oocytes énucléés bloqués en métaphase. Or le SCNT est possible non seulement avec des oocytes, mais aussi avec des zygotes (œufs fertilisés), prouvant que les facteurs de reprogrammation sont toujours présents à ce stade de développement.

Depuis, des cellules ntESCs (cellules ES obtenues par transfert nucléaire) ont pu être obtenues chez de nombreuses espèces, notamment les souris (largement utilisées dans les modèles expérimentaux) et les primates (Byren et al. 2007). Récemment, l'équipe de Tachibana obtint des ntESCs humaines spécifiques de la cellule somatique donneuse par

dérivation de blastocystes humains clonés, mais en conservant le génome de l'oocyte (la lignée obtenue est donc triploïde) (Tachibana et al. 2013). On pourrait donc obtenir techniquement parlant des cellules ES spécifiques au patient, c'est le clonage dit « thérapeutique », mais la triploïdie empêche leur utilisation thérapeutique. De plus, cela n'est pas sans soulever des questions éthiques puisque rappelons que le clonage thérapeutique n'est pas très éloigné du clonage reproductif puisque la seule différence réside dans la réimplantation ou non dans l'utérus maternel de l'embryon obtenu par transfert nucléaire.

Malgré toutes ces avancées, l'efficacité de reprogrammation reste très faible (notamment chez la souris, environ 1%) et d'importantes anomalies sont observées chez les animaux clonés : expression de gènes aberrants dans l'embryon obtenu, élongation des télomères, obésité chez l'adulte, système immunitaire déficient et souvent une susceptibilité aux cancers augmentée et une mort prématurée. Diverses méthodes ont été testées pour dépasser ces problèmes (molécules chimiques, inhibition de cytokines, fusion des cellules...) mais elles n'ont pas vraiment réussi à augmenter l'efficacité du clonage par SCNT (Thuan et al. 2010). Tout vient à penser que la reprogrammation nucléaire est en réalité incomplète à cause d'une « mémoire épigénétique » de la cellule donneuse. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes de régulation des gènes, en particulier ceux de la mémoire épigénétique, semble indispensable pour permettre l'amélioration du SCNT.

Remarque : l'ANT (transfert nucléaire altéré) est une variation du SCNT utilisant des noyaux d'oocytes dont le gène *Cdx2*, utile à la formation du trophoblaste, a été délété. L'embryon n'est pas complet, il ne peut être réimplanté et il n'y a pas de création d'embryon. (Meissner et Jaenisch, 2006)

c) La reprogrammation induite

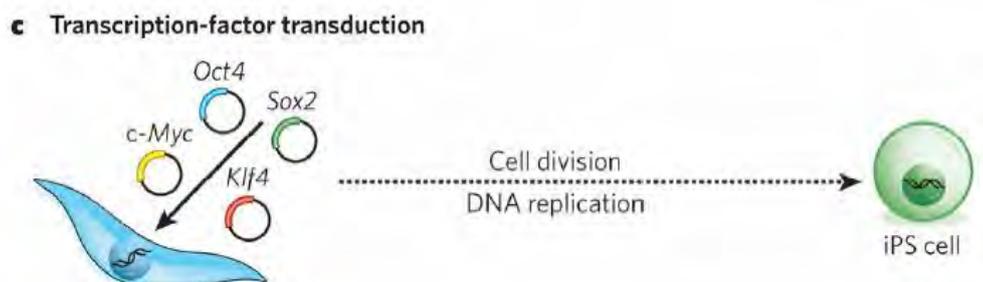


Figure 8 : La transduction de facteurs de transcription (Yamanaka et Blau, 2010)

C'est en surexprimant seulement quelques gènes, par l'introduction de facteurs de transcription dans n'importe quelle cellule différenciée du corps, que les premières cellules pluripotentes induites iPS firent leur apparition en 2006 (figure 8). Une facilité déconcertante d'obtention qui expliqua l'engouement scientifique qui suivit. Nous expliquerons les mécanismes de cette reprogrammation induite en détail un peu plus tard.

d) La transdifférenciation intratissulaire

Puisque l'on arrive à forcer une cellule adulte, différenciée, à « rajeunir » en cellule pluripotente, pourquoi ne pas passer directement d'une cellule différenciée à une autre, sans passer par le stade cellule souche ? Cette « transdifférenciation » fut réussie par Graf et al. en 2009, en forçant un fibroblaste de souris à acquérir directement des propriétés de cardiomyocyte, ou comme avec John de Vos et al. en 2010 en obtenant des propriétés de neurone, ou encore en transformant des cellules alpha du pancréas, exocrines, en cellules bêta sécrétrices d'insuline (Collombat et al. 2009). On voit bien avec ces expériences la flexibilité cellulaire, leur relative « plasticité » (L.Coulombel, 2010).

Pour finir, il existe quelques autres techniques de reprogrammation anecdotiques, comme la reprogrammation spontanée par culture à long terme, la parthénogénèse et le traitement de cellules somatiques par des extraits protéiques préparés à partir de cellules pluripotentes (J.Brault, 2013).

2) Les cellules souches embryonnaires ES

L'histoire des cellules souches embryonnaires ou cellules ES commença en 1981 lorsque Martin Evans (prix Nobel de médecine 2007) et Gail Martin isolèrent les premières cellules ES de souris, à partir de l'embryon au stade blastocyste (Evans et Kaufman, 1981 ; Martin, 1981). Ce n'est que 17 ans plus tard, en 1998, que furent obtenues les premières lignées humaines, grand espoir en terme de potentiel thérapeutique et de recherche en biologie du développement (Thomson et al, 1998).

Les lois de bioéthique d'août 1994 interdisaient alors toute recherche sur les embryons humains, mais les révisions des lois de bioéthique en 2004 les autorisèrent à titre dérogatoire,

à condition que cela permette des « progrès thérapeutiques majeurs », complété par le décret de février 2006. Ces changements permirent de mettre en place la plateforme de dérivation « ES-TEAM » sur les cellules ES humaines, à l'institut André Lwoff, et Anne-Lise Bennaceur-Griscelli obtint ainsi, en 2007, la première lignée française de cellules ES humaines (<http://www.u-psud.fr>). Cette autorisation par dérogation fut confirmée 5 ans plus tard par les révisions de lois de bioéthique de 2011, puis passa à une autorisation encadrée en 2013.

a) Origine des blastocystes

Toutes ces lois de bioéthique affirment et réaffirment l'interdiction de « la conception in vitro d'embryon ou la constitution par clonage [transfert nucléaire] d'embryon humain à des fins de recherche » (article 2151-2). Mais si les cellules ES ne proviennent pas de blastocystes créés par SCNT dans un but de recherche, d'où viennent ces blastocystes ? Ces blastocystes sont ceux qui ont été créés dans le but d'une fécondation in vitro (FIV), mais qui n'ont pas été utilisés. En effet, lors d'une FIV, la ponction des liquides folliculaires permet de recueillir en moyenne 10 ovocytes (cela peut aller de 0 ovocytes (1%) à plus de 20 ovocytes recueillis (1,5%)) (www.fivfrance.com) qui seront fusionnés à des spermatozoïdes, ce qui aboutit à environ 5 embryons viables. Aujourd'hui, on ne transfère qu'un ou deux blastocystes dans la cavité utérine de la femme. Puisqu'il faut en moyenne 4 tentatives pour que la nidation soit effective, on aboutit à une statistique de 19 embryons conçus pour une naissance (www.bioethique.net). Ces embryons non implantés, appelés « embryons surnuméraires », vont être congelés à l'étape 4 cellules dans de l'azote liquide à -196°C et conservés maximum 5 ans au CECOS (centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme). Chaque année, les couples ayant des embryons conservés reçoivent une facturation de l'hôpital (remboursement pris en charge par la Sécurité Sociale) leur demandant s'ils souhaitent :

- poursuivre la conservation (pour 5 ans maximum),
- faire don à un couple stérile,
- faire don à la recherche,
- ou les détruire.

b) Isolement des cellules souches de l'ICM

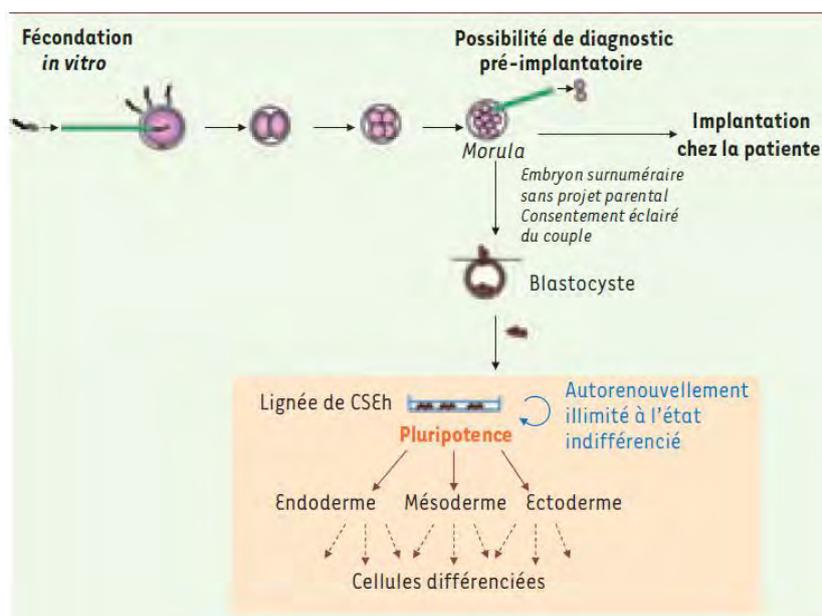


Figure 9 : Dérivation et propriétés biologiques des CSEh (Thèse Delphine Laustriat, 2010).

Si le couple choisit de donner ses embryons surnuméraires à la recherche, ces embryons seront triés par le diagnostic préimplantatoire DPI au stade 8 cellules (figure 9) (troisième jour) : une biopsie des blastomères permet de prélever de l'ADN, de l'analyser par PCR (polymerase chain reaction) ou FISH (fluorescence in situ hybridization). Le but est de déterminer si l'embryon porte ou non une mutation associée à une maladie génétique, ce qui permettrait l'obtention de lignées de cellules ES humaines modèles de cette pathologie (Laustriat, 2010). Puis les embryons sont mis en culture, et après 5 à 7 jours de développement, disséqués.

Il existe différentes méthodes permettant d'obtenir une lignée de cellules ES humaines à partir de l'ICM du blastocyste. La plus pratiquée est l'isolement immunochirurgical de l'ICM (Thompson et al, 1998). Il faut commencer par dissoudre la zone pellucide à l'aide d'une enzyme, la pronase, puis le trophoblaste périphérique est lysé par réaction anticorps-complément : les anticorps provenant d'un sérum total anti-humain et le complément d'un cochon d'Inde. L'inconvénient d'utiliser un complément d'origine animale est le risque de contamination de la lignée par des pathologies animales. De plus, pour que cela soit efficace, il faut que les embryons aient une ICM de grande taille et un contour bien distinct, ce qui n'est pas toujours le cas des embryons surnuméraires, souvent de moins bonne qualité que ceux que l'on implante chez la mère (D.Laustriat, 2010). Afin de contourner ces deux

désavantages, une autre méthode a été développée qui consiste à mettre l'embryon entier (zone pellucide à part) en culture, sans lyser le trophoblaste afin d'être sûr de ne pas perdre l'ICM (Heins et al, 2004). Mais dans ce cas, il se peut que les cellules trophoblastiques prolifèrent plus vite que les cellules ES humaines, d'où une perte de ces dernières. La dernière technique, d'efficacité équivalente à celle de la lyse immunochirurgicale, consiste à mettre en culture l'embryon partiel. A l'aide d'une pipette ultrafine, on isole la région contenant l'ICM et on la met en culture, ce qui permet d'éviter que les cellules du trophoblaste n'interfèrent (Kim et al, 2005).

c) Mise en culture des cellules ES humaines.

L'équipe de Thompson, en s'inspirant des cellules ES murines, établirent les premiers protocoles de culture des cellules ES humaines (Thompson et al, 1998), encore utilisés aujourd'hui. Ils sont composés de cellules nourricières baignant dans du DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) à 20% de sérum de veau fœtal, 1mM de glutamine, 0,1mM de bétamercaptoéthanol, 1% d'acides aminés non essentiels, avec ou sans antibiotiques. Ajouter le facteur de croissance humain bFGF (basic fibroblast growth factor) permet de maintenir l'état indifférencié malgré une culture prolongée (chez la souris, on utilise le facteur LIF).

Le choix des cellules nourricières est primordial : en effet, celles-ci servent de support aux cellules ES humaines tout en maintenant leur croissance et leur état indifférencié en sécrétant des facteurs dans le milieu de culture. Dans les commencements, les cellules nourricières étaient des fibroblastes embryonnaires murins MEF, mais le mieux est d'utiliser des composants d'origine humaine (ex : cellules néonatales de prépuce humain) (Amit et al, 2003), de même pour le sérum de veau fœtal qui peut être remplacé par du sérum d'origine humaine (Richards et al, 2002). Depuis, certaines équipes ont développé des milieux chimiquement définis, par l'utilisation d'un ensemble de protéines complexe, ou encore l'ajout de petites molécules (fibronectine, laminine, composé Y-27632...) (Peiffer et al, 2010).

Au bout de quelques mois apparaîtront les premières colonies de cellules (en moyenne 30% des cellules aboutissent à une véritable lignée ES (www.inserm.fr)). Pour augmenter l'expansion de ces lignées, on en transfère plusieurs dans d'autres boîtes de culture (Tableau

I). Ce transfert, ou « passage », se fait soit par dissociation mécanique, soit par dissociation enzymatique (trypsine, collagénase, dispase) (D.Laustriat, 2010).

Tableau I : Avantages et inconvénients des techniques utilisées pour le passage des CSEh (D.Laustriat, 2010)

	<i>Transfert mécanique</i>	<i>Transfert enzymatique</i>
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Idéal pour le maintien des lignées de CSEh. - Transfert sélectif des cellules indifférenciées. - Obtention de portion de colonies de tailles égales. 	<ul style="list-style-type: none"> - Utile pour le travail avec une grande quantité de cellules. - Plus rapide et plus simple que le transfert mécanique.
Inconvénient s	<ul style="list-style-type: none"> - Long et laborieux. - Difficile à réaliser lors du travail avec un grand nombre de cellules. - Risque d'anomalies chromosomiques focalisées. 	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de sélection entre les cellules différenciées et indifférenciées. - Variation dans la taille des portions de colonies transférées. - Risque d'anomalies chromosomiques de type aneuploïdies.

d) Vérification de leur transformation effective

La dernière étape de la formation de cellules ES humaines consiste à s'assurer que les cellules mises en cultures sont bien des cellules dites ES. Pour cela, on les identifie par :

- leur morphologie : gros noyau, colonies circulaires aux contours réguliers ;
- leur caryotype : quelques anomalies récurrentes sont retrouvées, notamment sur les chromosomes 12, 17, 18 et X, qui pourraient être des avantages concernant la prolifération ou la survie du clone ;
- leur activité télomérasique : les cellules ES ont une forte expression de la TERT (telomerase reverse transcriptase), une des 2 sous-unités de la télomérase, complexe empêchant la dégradation des télomères (extrémités de l'ADN) et ainsi permettant l'immortalité de ces cellules ;
- l'expression de marqueurs de surface : les glycolipides SSEA-3 et SSEA-4 (*Stage-specific embryonic antigen*) (et non SSEA-1 comme chez la souris, puisque chez l'homme il permet la différenciation trophoblastique), les kératanes sulfates TRA-1-60 et TRA-1-81 (*Tumour rejection antigen*), et d'autres marqueurs comme GTCM2 (*Germ cell tumour marker*). (D.Laustriat, 2010)

Caractériser ainsi les cellules ES est suffisant, mais on peut bien sûr s'assurer de leur pluripotence par les tests de pluripotence évoqués plus haut : la différenciation in vitro, la formation de tératomes in vivo, la formation de chimères avec transmission germinale, et la complémentation d'un blastocyste tétraploïde.

3) Les cellules souches pluripotentes induites iPS

Les cellules iPS furent découvertes par les Professeurs Yamanaka et Takahashi en 2006 : ces deux chercheurs obtinrent la transformation de fibroblastes de souris en cellules ayant toutes les capacités des cellules embryonnaires par la seule introduction de quatre gènes codant pour des facteurs de transcription, choisis parmi 24 gènes candidats impliqués dans la pluripotence des cellules embryonnaires. Un an plus tard, la même équipe obtinrent des cellules iPS à partir de fibroblastes humains. Ce fut une véritable révolution dans le monde scientifique puisque ces cellules, bien que pluripotentes, ne proviennent pas d'embryons mais d'individus adultes. Cela a d'ailleurs valu au professeur Yamanaka le prix Nobel de physiologie et médecine en 2012 avec le Professeur John Gurdon (Bionest Partner, 2010).

Le processus de reprogrammation, bien qu'ayant une trame de base, est constitué de différents paramètres variant d'une technique à l'autre, selon chaque équipe de scientifiques :

- le choix de la cellule souche que l'on va reprogrammer ;
- le choix des facteurs de reprogrammation ;
- le choix de la méthode de vectorisation dans un but de reprogrammation.

a) Choix des cellules reprogrammées

Les cellules reprogrammées par Yamanaka furent tout d'abord des fibroblastes murins, puis humains. Les fibroblastes ont en effet trois avantages sur les autres types de cellules : un moyen d'obtention simple et sans risque (par simple biopsie de peau), une facilité d'amplification en culture, et une plus grande propension à se reprogrammer. Depuis, diverses autres cellules ont été transformées en cellules iPS avec succès. Chez la souris : des cellules progénitrices neurales (JB.Kim et al. 2008), des hépatocytes et cellules épithéliales gastriques (Aoi et al. 2008), des cellules pancréatiques (Stadtfeld et al. 2008), des cellules sanguines dont les lymphocytes B (Hanna et al. 2008)... et chez l'homme, ce sont principalement les kératinocytes (Aasen et al. 2008) provenant d'une biopsie de peau ou d'un cheveu arraché qui sont majoritairement utilisés. Leur reprogrammation est en effet 100 fois plus efficace et deux fois plus rapide (10 jours suffisent) qu'avec des fibroblastes. (Yamanaka, 2009)

L'efficacité de la reprogrammation sera donc déterminée en partie par le choix de ces cellules sources. La reprogrammation sera d'autant plus aisée que ces cellules posséderont (Brault, 2013) :

- un stade de différenciation précoce : les progéniteurs hématopoïétiques sont plus faciles à reprogrammer que les lymphocytes B ou T
- un âge plus jeune (par l'âge du donneur ou l'âge de la culture), c'est-à-dire avec moins de lésions génétiques accumulées
- une forte expression de facteurs de reprogrammation au sein de la cellule
- un statut épigénétique particulier propre à la cellule la rendant plus facilement reprogrammable. En effet, le remodelage de la chromatine est une étape limitante lors de la génération de cellules iPS. On peut aussi provoquer des modifications épigénétiques par des molécules, tels que les inhibiteurs d'ADN méthyltransférase DNMT (5'-azacytidine), les inhibiteurs de l'histone désacétylase HDAC (acide valproïque, trichostatine), ou les inhibiteurs de l'histone G9a méthyltransférase HMT (Okita, Yamanaka et al, 2010).

b) Choix des facteurs de reprogrammation

Pour obtenir cette reprogrammation, Takahashi et Yamanaka s'appuyèrent sur les 24 gènes spécifiques aux cellules ES. En poussant des cellules somatiques à exprimer ces gènes, peut-être prendraient-elles quelques-unes des caractéristiques des cellules ES. Pour cela, ils commencèrent par obtenir une cassette de sélection de molécules sous le contrôle d'un promoteur actif uniquement dans les cellules ES : Fbx15. Les cellules utilisées étaient des fibroblastes de souris, ou MEF (mouse embryonic fibroblasts). Dix gènes candidats furent ainsi introduits dans le promoteur Fbx15 : ce fut la première synthèse de cellules iPS, que l'on nomma « iPS-MEF10 ». Ils firent un deuxième essai avec uniquement 4 gènes : Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4 et obtinrent des cellules « iPS-MEF4 » ayant les mêmes caractéristiques que les cellules ES ! (Rodolfa, Eggan et al, 2006)

Ainsi, seuls quatre gènes sont nécessaires à une reprogrammation. Le but étant d'éliminer les marques épigénétiques propres aux cellules sources (les fibroblastes pour

Yamanaka), et d'établir de nouvelles marques caractéristiques de la pluripotence. Les quatre facteurs retenus par Yamanaka sont (D.Germain, 2009) :

- Oct3/4 (octamer-binding transcription factor 3 ou 4), cette protéine intervient lors du passage de la morula au blastocyste ;
- Sox2, ou SRY-box2 : il peut former un hétérodimère avec Oct4 ;

Ces deux facteurs sont cruciaux dans le processus de reprogrammation car ils induisent l'activation du réseau de pluripotence et la capacité d'auto-renouvellement, tout particulièrement Oct3/4 que l'on ne retrouve que dans les cellules souches pluripotentes.

- c-Myc est un oncogène connu pour induire l'auto-renouvellement et la prolifération (il agit notamment sur la télomérase), et il agirait aussi directement sur la régulation de la transcription. Certains scientifiques pensent même qu'il induirait une acétylation d'histones, en permettant à Oct3/4 et Sox2 de se fixer à des sites habituellement inaccessibles.
- Klf4 (Krüppel-like factor 4), lui, n'agit que sur la transcription. Il peut l'activer ou la réprimer, et donc fonctionner comme une oncoprotéine ou un suppresseur de tumeur. Il agit en réprimant p53 (Rodolfa, Kevin et al, 2006).

Il est important pour une reprogrammation efficace d'avoir une bonne balance entre ces deux oncogènes puisque Klf4, en réprimant p53, inhibe l'apoptose induite par c-Myc (Brault, 2013). Toutefois, ils ne sont pas indispensables puisque l'équipe de Huangfu a pu s'en passer grâce à l'acide valproïque (inhibiteur de l'histone désacétylase) sans qu'il n'y ait de baisse d'efficacité de la reprogrammation. Au même moment, l'équipe de J. Thomson a choisi deux autres facteurs, outre Oct3 et Sox2 :

- Lin 28 : cette protéine à effet modeste, exprimée au début de l'embryogénèse, stimule la division et la différenciation cellulaire ;
- Nanog intervient dans le maintien des propriétés d'auto-renouvellement et de pluripotence des cellules embryonnaires (Germain, 2009). Par l'intermédiaire de p53, Nanog peut être activé par Klf4.

Le choix de ces facteurs dépend de chaque équipe. Certains utilisent le « cocktail Yamanaka » OKSM (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc), d'autres le « cocktail Thomson » OKLN (Oct3/4, Sox2, Lin 28, Nanog), d'autres encore les six facteurs à la fois afin d'augmenter l'efficacité de la reprogrammation, comme l'a fait l'équipe de J.Liao (Liao et al, 2008). Plusieurs équipes n'ont utilisés que les 2 facteurs principaux Oct4 et Sox2, et pour éviter que

l'efficacité de la reprogrammation ne diminue, l'équipe de Giorgetti a utilisé des cellules progénitrices (les cellules du cordon ombilical) tandis que l'équipe de Huangfu a joué sur les mécanismes épigénétiques de remodelage de la chromatine (avec l'acide valproïque, inhibiteur de l'histone déacétylase). On peut agir également sur certaines voies de signalisation : bloquer la voie p53/p21 augmente l'efficacité et la rapidité de la reprogrammation, mais en contrepartie induit une instabilité génomique (formation de tumeurs) (Brault, 2013). Ces composés chimiques agissant dans les mécanismes de la reprogrammation sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (Tableau II).

Tableau II : Molécules favorisant la reprogrammation en cellules iPS (T.Lemonnier, 2012).

Molécule	Type	Origine des cellules reprogrammées
BIX-01294	Inhibiteur d'histone méthyltransférase	Murine
Parnate	Inhibiteur de la H3K4 déméthylase	Humaine
5-azacitidine	Inhibiteur de méthyltransférase de l'ADN	Murine
RG108	Inhibiteur de méthyltransférase de l'ADN	Murine
Trichostatine A (TSA)	Inhibiteur d'histone déacétylases	Murine
Acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA)	Inhibiteur d'histone déacétylases	Murine
Acide valproïque (VPA)	Inhibiteur d'histone déacétylases	Humaine
CHIR99021	Inhibiteur de la Glycogène synthase kinase 3 (GSK3)	Murine/humaine
Kenpaullone	Inhibiteur de la Glycogène synthase kinase 3 (GSK3)	Murine
A-83-01	Inhibiteur de la voie du TGFβ	Humaine
E-616451	Inhibiteur de la voie du TGFβ	Murine
E-616452 (RepSox)	Inhibiteur de la voie du TGFβ	Murine
PD0325901	Inhibiteur des MEK (MAP/Erk kinase)	Humaine
BayK8644	Agoniste pour le canal calcique L	Murine
EI-275	Inhibiteur de la kinase Src	Murine

Enfin, la balance entre chaque facteur et leur niveau d'expression intervient dans l'efficacité de la reprogrammation. Celle-ci est meilleure avec une proportion plus élevée du facteur Oct3/4, mais la reprogrammation ne se fait plus avec une trop forte expression d'Oct3/4. Au contraire, l'augmentation des trois autres facteurs Sox2, Klf4 et c-Myc diminue l'induction en cellules iPS. Il existerait donc une stœchiométrie optimale d'expression de ces facteurs (Papapetrou et al, 2009).

c) Choix de la méthode de vectorisation

Les cellules iPS furent tout d'abord obtenues par des méthodes intégratives, à l'aide de rétrovirus ou de lentivirus, comme je vais le développer par la suite. Mais ce type d'intégration ne garantissait pas une bonne sécurité à long terme. Un nouveau protocole proposa alors de retirer les transgènes par une stratégie d'excision, mais cela restait complexe et long à mettre en œuvre. On réussit ensuite à obtenir des cellules iPS sans intégration. On trouva différents vecteurs non-intégratifs, comme l'adénovirus, le virus Sendai et les plasmides. Enfin, les dernières techniques réussirent à ne pas utiliser de vecteur, mais des ARNm ou encore des protéines recombinantes (tableau III).

Tableau III : Tableau récapitulatif des principales méthodes de reprogrammation. (J.Brault 2013)

Type de vecteur	INTÉGRATION				SANS INTÉGRATION					
	Vecteurs intégratifs		Vecteurs excisables		Vecteurs non intégratifs			Méthodes sans vecteurs		
	Rétrovirus	Lentivirus	Lentivirus floxé	Transposon	Adénovirus	Plasmides	Virus Sendai	Protéines	ARNm	miRNA
Efficacité de reprogrammation	0,01-0,5%	0,1-1%	0,1-1%	0,1%	0,001%	0,001%	0,02-1%	0,001%	1%	0,01-0,5%
Avantages	Efficacité	Efficacité	Efficacité, pas d'intégration	Efficacité raisonnable, pas d'intégration	Pas d'intégration	Pas d'intégration	Efficacité, pas d'intégration	Pas d'intégration, pas d'ADN	Pas d'intégration, efficacité	Pas d'intégration, efficacité
Inconvénients	Intégrations multiples, réactivation des transgènes	Intégrations multiples, réactivation des transgènes	Obtention des lignées laborieuse	Obtention des lignées laborieuse	Faible efficacité	Faible efficacité, intégration occasionnelle	Efficacité moyenne sur les cellules matures	Faible efficacité	Plusieurs transfections nécessaires	Plusieurs transfections nécessaires

i. Méthodes avec intégration

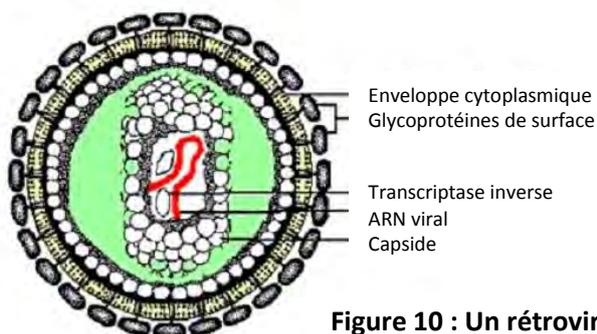


Figure 10 : Un rétrovirus

Rétrovirus : un rétrovirus est un virus à ARN ayant la particularité de posséder la transcriptase inverse TI (ou RT pour reverse transcriptase). Cette enzyme peut rétro-transcrire son génome ARN en ADN pour qu'il s'intègre ensuite dans le génome de la cellule hôte en cours de division (ex : le rétrovirus

MMLV (murine Malloney Leukemia Virus) utilisé pour produire les premières iPS). L'efficacité de transduction est assez bonne (>90%) mais les sites et le nombre d'insertions dans le génome ne pouvant être maîtrisés (parfois plus de 20 intégrations par clone), des altérations génétiques peuvent apparaître augmentant le risque de transformation cancéreuse.

De plus, « cette intégration aléatoire peut entraîner le *silencing* ou la fusion avec des gènes endogènes, voire même bloquer la différenciation vers certains lignages » (J.Brault, 2013). Pour pallier à cela, l'équipe de Zhang a utilisé un vecteur viral polycistronique codant pour les 4 facteurs OSKM afin de n'avoir qu'une seule intégration par clone (Zhang et al, 2011).

Lentivirus : ce type de virus est de la même famille que les rétrovirus mais il a l'avantage de pouvoir s'intégrer dans le génome de cellules en division ou quiescentes (on peut donc les utiliser sur une plus large variété de cellules). Leur nom s'explique par la longue période d'incubation nécessaire avant la manifestation de leur pouvoir pathogène sur les cellules (ex : le virus HIV). Tout comme avec un rétrovirus, l'utilisation d'un vecteur lentiviral polycistronique pour limiter le nombre d'intégration est possible.

Deux stratégies ont permis de retirer les transgènes de leurs sites d'intégration : le système Cre-loxP basé sur la recombinaison, et le système piggyBac (PB) basé sur la transposition. Avec le protocole de l'équipe de Soldner (Soldner et al, 2009), le système de recombinaison Cre-loxP s'auto-retire du génome. Cependant, des séquences loxP et des fragments d'ADN du vecteur peuvent subsister et provoquer une instabilité. L'avantage du système transposon/transposase piggyBac de l'équipe de Woltjen (Woltjen et al, 2009), c'est qu'il n'y a pas de risque de laisser de trace ou de fragments d'ADN exogène dans le génome de la cellule reprogrammée. Ainsi, bien que l'utilisation de lentivirus soit plus longue qu'avec un rétrovirus, elle est significativement plus sûre, plus efficace et plus facile à utiliser (O'Malley et al, 2009).

ii. Méthodes sans intégration

Adénovirus : ce sont des virus à ADN double brin non intégratifs. Stadtfeld et al. (2009) furent les premiers à obtenir des cellules iPS sans intégration de transgène par l'introduction dans des hépatocytes de quatre vecteurs adénovirus portant les facteurs de reprogrammation. Il est vrai que cette méthode requiert des transfections répétées puisque l'expression du transgène est transitoire, mais elle altère bien moins le génome que les méthodes intégratives.

Virus Sendai : ce virus à ARN non intégratif réplique son génome uniquement dans le cytoplasme de la cellule transfectée. L'efficacité est plus élevée qu'avec un adénovirus et la

sécurité est assurée puisque l'expression du virus diminue d'elle-même progressivement au cours des cultures. S'il peut rester quelques cellules iPS ayant conservé le génome viral, il est facile de les sélectionner, soit par un anticorps dirigé contre les cellules infectées, soit en jouant sur la température (lorsqu'on utilise le mutant du virus Sendai, thermosensible). (J.Brault, 2013)

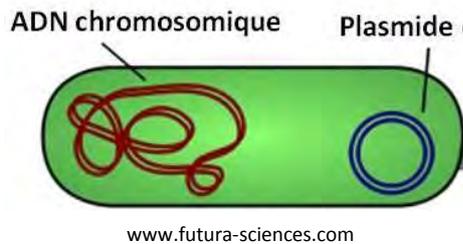


Figure 11 : ADN chromosomique et plasmide

Vecteurs plasmidiques : un plasmide est une molécule d'ADN bicaténaire cytoplasmique, généralement circulaire et de petite taille, se répliquant de façon autonome à l'ADN chromosomique et non essentiel à la survie de la cellule hôte. Lorsque l'on parle de plasmides sous forme épisomale, cela signifie qu'ils peuvent s'intégrer aux chromosomes.

L'équipe d'Okita (2008) fut la première à utiliser des transfections répétées de plusieurs plasmides sous forme non épisomale, suivie par Gonzalez et al. (2009) avec un seul plasmide polycistronique (comportant plusieurs informations génétiques en un seul plasmide) dans des MEFs de souris. Cette technique a pu être appliquée aux cellules humaines avec l'avantage d'être moins coûteuse et plus sûre qu'avec des virus intégratifs, bien que moins efficace. Utiliser un plasmide épisomal ne nécessite qu'une seule transfection, et celui-ci s'élimine de lui-même sans qu'une sélection ne soit nécessaire.

D'autres vecteurs encore ont été utilisés, tels les vecteurs ADN « minicircle » (ADN super enroulé de petite taille), ou bien les ADNc s'intégrant grâce à un bactériophage... (J.Brault, 2013)

iii. Méthodes sans vecteurs

ARN modifiés : en 2010, l'équipe du Pr. Warren réussit à éviter toute manipulation génétique en utilisant des ARN modifiés, augmentant ainsi l'efficacité des reprogrammations (Warren et al, 2010). Une administration répétée journalière d'ARNm synthétiques est plus efficace et rapide qu'avec des virus. Cela permet d'éviter totalement le risque d'intégration génomique ou d'insertion mutagène, ainsi que le *silencing* viral. Les cellules iPS obtenues,

plus homogènes, ressemblent davantage aux cellules ES. Ces ARNm peuvent toutefois déclencher une réponse immunitaire antivirale.

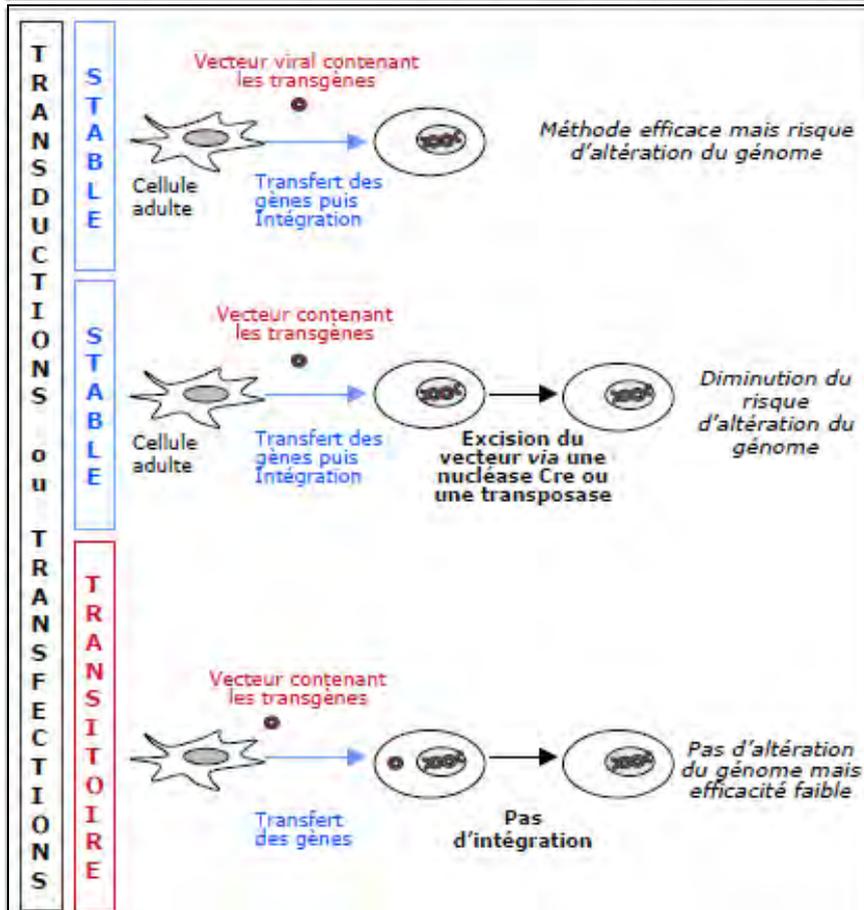
Protéines recombinantes : Zhou et al. (2009) ont été les premiers à utiliser un CPP (Cell Penetrating Peptide), un vecteur se combinant aux facteurs de transcription afin de les transférer à travers la membrane de la cellule à reprogrammer. Leur CPP composé de 11 résidus arginine (11R) mis 30 jours à reprogrammer les cellules avec une efficacité de 0,001%. Plus récemment, Zhang et al. (2012) obtinrent des cellules iPS en 13 jours pour une meilleure efficacité (0,01%) grâce au CPP HIV-TAT (HIV-transactivator protein) et les 6 facteurs de transcription OSKMN (J.Brault, 2013).

Toutes ces techniques très diverses ont leurs avantages et leurs inconvénients, leur choix se fera donc en fonction de l'usage souhaité. La préférence pourtant penche vers l'utilisation du virus Sendai ou bien l'ARNm.

La figure ci-dessous permet de récapituler les différentes techniques de reprogrammation, classées selon qu'elles utilisent le génie génétique, avec ou sans intégration, ou bien sans génie génétique, par des composés chimiques ou des petites protéines (figure 12).

Comparaison des technologies de génie génétique utilisées

Bionest Partner, 2010



Avec intégration

Rétrovirus

(Takahashi et Yamanaka, 2006
 polycistronique : Zhang et al, 2011)

Lentivirus

(Cre-loxP : Soldner et al, 2009
 piggyBac : Woltjen et al, 2009)

Sans intégration

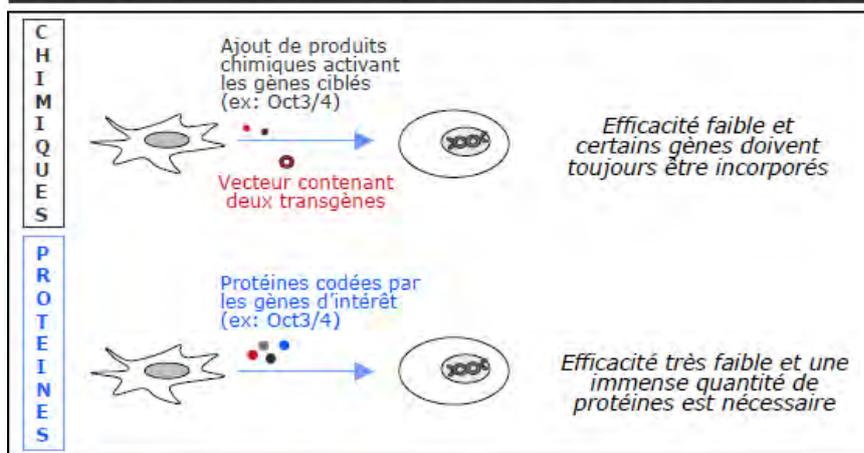
Adénovirus

(Stadfeld, 2009)

Plasmides

(Okita et al, 2008
 Gonzalez et al, 2009)

Comparaison des technologies « hors génétique » utilisées



Sans vecteur

ARNm

Produits chimiques

(ac.valproïque : Huangfu et al, 2008)

Protéines recombinantes

(CPP 11R : Zhou et al. 2009
 CPP HIV-TAT : Zhang et al. 2012)

Figure 12 : Récapitulatif des techniques de reprogrammation existantes (Bionest Partner, 2010).

Deuxième Chapitre : Comparaisons entre cellules ES et cellules iPS

A. Utilisation des cellules souches

1) Les cellules souches pluripotentes : un outil précieux pour la recherche

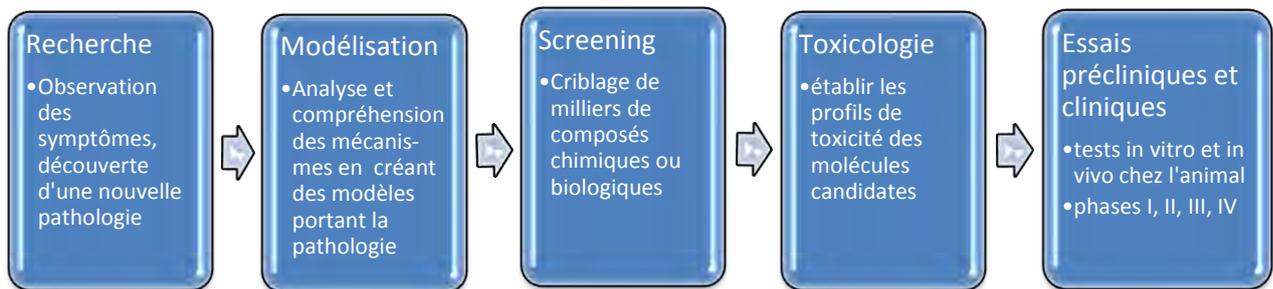


Figure 13 : la démarche scientifique menant à la découverte de nouvelles thérapies

Lorsque l'on veut comprendre les mécanismes d'une pathologie génétique et les différentes possibilités d'agir sur ses composants, lorsque l'on veut connaître les molécules pharmaceutiques ainsi que les techniques permettant de rétablir un état normal, plusieurs étapes sont nécessaires (figure 13). Dans le cas des cellules souches ES ou iPS, il faut commencer par recréer les anomalies principales de la pathologie à l'aide de cellules souches porteuses de la mutation (modélisation). Ensuite, on induit leur différenciation dans le type de cellule spécialisée souhaité, on essaye d'identifier les molécules dysfonctionnelles (recherche) et on crible des banques de composés chimiques (screening) à la recherche de ceux qui corrigeraient ces anomalies. Enfin, on peut tester une approche de thérapie cellulaire utilisant des progéniteurs (cellules issues de cellules souches mais ayant déjà acquis un certain degré de spécialisation). Ces étapes vont être évoquées brièvement, car ce sont les applications cliniques qui nous intéressent ici, et non les utilisations en recherche fondamentale, bien qu'elle soit une part très importante du processus menant à la thérapeutique.

a) La modélisation pathologique

Les modèles cellulaires pathologiques permettent d'étudier les mécanismes physiopathologiques d'une maladie donnée, d'identifier et de développer *in vitro* des molécules d'intérêt qui seront développées pour donner des médicaments. Ces cellules ne sont pas injectées au patient, mais servent de support pour tester les molécules pharmaceutiques : compréhension des mécanismes d'action au niveau cellulaire, tests de toxicité, d'efficacité... La ressource biologique est malheureusement souvent rare, par la difficulté de son accès (ex : biopsie du cerveau, foie...) et par sa rareté (maladie génétique), et les prélèvements ne peuvent qu'être limités. Pour pallier à ces problèmes, on utilise aujourd'hui des cellules cancéreuses ou immortalisées par manipulation génétique, mais ces modèles restent éloignés de la maladie et peuvent conduire à des résultats erronés. C'est pourquoi l'utilisation de cellules souches pluripotentes offre de nouveaux espoirs, en particulier dans la modélisation des maladies monogéniques. Les cellules utilisées sont des cellules iPS des patients eux-mêmes, ou bien des cellules ES, obtenues soit par introduction d'une modification génétique dans les cellules ES dérivées d'un embryon surnuméraire normal, soit par dérivation à partir d'un embryon porteur d'une mutation identifiée dans le cadre du DPI. Ainsi en 2012, 14 maladies étaient déjà modélisées à partir de cellules ES et iPS humaines (Maury et al, 2012) et elles sont bien plus nombreuses aujourd'hui (tableau IV).

Tableau IV : exemples non exhaustifs de voies de différenciation explorées à l'aide des hESC et iPSC (à partir d'un tableau de D.Laustriat, 2010)

Feuillet	Type cellulaire	Pathologies visées	Publications avec hESC	Publications avec iPSC
Ectoderme	Progéniteurs rétiens	DMLA, maladie de Stargardt	Haruta et al, 2004 ; Idelson et al, 2009 ; Meyer et al, 2009	Kanemura et al, 2014
	Neurones	Maladie d'Alzheimer, de Parkinson, chorée d'Huntington	Dhara et Stice, 2008 ; Aubry et al, 2008 ; Valensi-Kurtz et al, 2010	Lee et al, 2009 ; Nguyen et al, 2011 ; Brennan et al, 2011 ; Israel et al, 2012
	Astrocytes		Lee et al, 2006	
	Oligodendrocytes		Hu et al, 2009	
	Motoneurones	Lésions de la moelle épinière, SLA	Hu et Zhang, 2009 Wada et al, 2009	Dimos et al, 2008 Ebert et al, 2009 Okano, Yamanaka, 2014
	Kératinocytes	Epidermolyse bulleuse, ulcères chroniques de la jambe, grands brûlés	Guenou et al, 2009	Bilousova et al, 2011 ; Tolar et al., 2011 ; Itoh et al., 2011
Mésoderme	Cellules hématopoïétiques	Leucémie, anémie, cancer	Kaufman, 2009	
	Cellules endothéliales	Maladies vasculaires	James et al, 2010	
	Cellules		Olivier et al, 2006 ;	

	mésenchymateuses		Barberi et al, 2007	
	Adipocytes		Taura et al, 2009	
	Chondrocytes	Régénération du cartilage, ostéoarthrose	Bigdeli et al, 2009 ; Toh et al, 2010	
	Ostéocytes	Ostéonécrose, ostéoporose	Bielby et al, 2004 ; Karner et al, 2007 ; Tremodela et al, 2008 ; Lee et al, 2009	
	Cardiomyocytes	Insuffisance cardiaque, infarctus	Behfar et al, 2002 ; Tomescot et al, 2007 ; Vidarsson et al, 2010 ; Menasché et al, 2014	Miao et al, 2014
	Muscle lisse	Dystrophies musculaires	Kurpinski et al, 2010	
Muscle squelettique	Chan et al, 2006 ; Barberi et al, 2007 ; Stavropoulos et al, 2009			
Endoderme	Hépatocytes	Cirrhose, hépatite, insuffisance hépatique	Soderdahl et al, 2007 ; Hey et al, 2008, Agarwal et al, 2008 ; Brolen et al, 2010	Rashid et al, 2010 Touboul et al, 2010
	Cellules pancréatiques	Diabètes	Trounson, 2006 ; VanHoof et al, 2007 ; Schulz et al, 2012	Stadtfeld et al, 2008
Feuillet	Type cellulaire	Pathologies visées	Publications avec hESC	Publications avec iPC

b) Le screening

Au cours du criblage à haut débit, ou screening, on cultive de grandes quantités de cellules affectées par la maladie, dérivées des cellules souches pluripotentes. Puis le modèle cellulaire muté est mis en contact avec des dizaines de milliers de molécules chimiques ou biologiques. L'observation des effets sur la physiologie ou la survie des cellules permet de développer un test spécifique mettant en évidence les molécules (ou « hits », « touches ») qui peuvent normaliser le modèle pathologique. Les résultats avec des cellules souches sont très reproductibles et pertinents (car générés avec des cellules humaines), ce qui place les cellules souches comme un outil précieux pour la recherche de médicament.

Il faut donc créer des banques de cellules ES ou iPS afin de tester les molécules. Par exemple, la banque de cellules souches *UK Stem Cell Bank* existe depuis 2003 et recense toutes les lignées de cellules souches disponibles, classées par origine, pays et caryotype (www.nibsc.org) (Tableau V). Tout récemment, en février 2014, l'IMI (initiative en matière de médicaments innovants) a lancé le projet de développement à grande échelle des cellules iPS (Turner et al, 2013). Pour cela, 26 partenaires publics et privés ont décidé de se regrouper pour créer l'European Bank for Induced Pluripotent Stem Cells (EBiSC), la coordination revenant aux laboratoires Pfizer (Cambridge, Royaume-Uni) et Roslin Cells (Edimbourg,

Royaume-Uni). Ce projet, d'un montant de 35 millions d'euros, fournira des lignées de cellules iPS fiables puisque répondant aux critères internationaux. Ces cellules iPS ainsi distribuées permettront de déterminer les effets secondaires que les médicaments pourraient avoir sur les patients sans avoir à réaliser de tests sur les animaux ou les personnes.

Tableau V : Banques et registres de cellules souches existants

Banques ou registres (année de création)	Ressources	Financement
UK Stem Cell Bank (2003)	14 lignées	Royaume-Uni
US National Stem Cell Bank (2005)	19 lignées	Royaume-Uni
Harvard Stem Cell Institute (2004)	17 lignées de hESC	Harvard University, Howard Hughes Medical Institute et autres institutions privées
European Bank for Induced Pluripotent Stem Cells (en cours de création)	En cours de création	26 partenaires de nombreux pays autour du monde
European hESC Registry (2008)	630 lignées de hESC répertoriées	Royaume-Uni
International Stem Cell Registry (2008)	492 lignées de hESC et iPSC répertoriées	Massachusetts Life Sciences Center

c) En toxicologie

Les cellules souches sont utiles en toxicologie prédictive grâce au fait qu'on puisse les cultiver en grand nombre, puis les différencier. La majorité des effets toxiques et des effets indésirables constatés au cours du développement clinique ou après la mise sur le marché d'une molécule concerne l'hépatotoxicité et la cardiotoxicité (A.Denis, 2011) ; il est donc intéressant de différencier les cellules souches pluripotentes en hépatocytes et cardiomyocytes tout particulièrement. On étudie alors leur réponse aux médicaments candidats ce qui permet d'obtenir des profils de toxicité améliorant l'évaluation préclinique qui suivra (Bionest Partner, 2007). Les réglementations actuelles (notamment de l'OCDE) tendant à limiter l'utilisation des animaux pour les études, on comprend l'intérêt que peuvent avoir ces cellules, capables d'être largement cultivées et différenciées en n'importe quelle cellule.

2) Les cellules souches pluripotentes, un outil en thérapie cellulaire et médecine régénératrice.

a) Définitions

i. La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire vise à restaurer les fonctions d'un tissu ou d'un organe *in situ* à l'aide de greffes de cellules vivantes, c'est-à-dire par transfert *in vivo* de cellules ou de tissus choisis, multipliés et pharmacologiquement traités *in vitro* (Sawadogo et al., 2010). Les cellules utilisées peuvent provenir de quatre sources différentes (figure 14). Elles proviennent soit d'une autre espèce (cellules xénogéniques) soit d'une lignée cellulaire (cellules immortalisées), ces deux sources n'étant bien sûr pas utilisées dans le cas de la thérapie cellulaire humaine. Elles peuvent provenir aussi d'un donneur (cellules allogéniques), comme par exemple lors de greffes de moelle osseuse, pratiquées couramment déjà depuis plusieurs dizaines d'années dans le traitement des maladies du sang (leucémies, anémies) (www.inserm.fr). Enfin, les cellules utilisées peuvent provenir du patient lui-même (cellules autologues), ce qui a le grand avantage d'éviter les problèmes d'immunotolérance. Par exemple, l'autogreffe de peau, par mise en culture de kératinocytes du receveur, est utilisée chez les grands brûlés. Autre exemple qui nous intéressera tout particulièrement, l'utilisation de cellules souches pluripotentes.

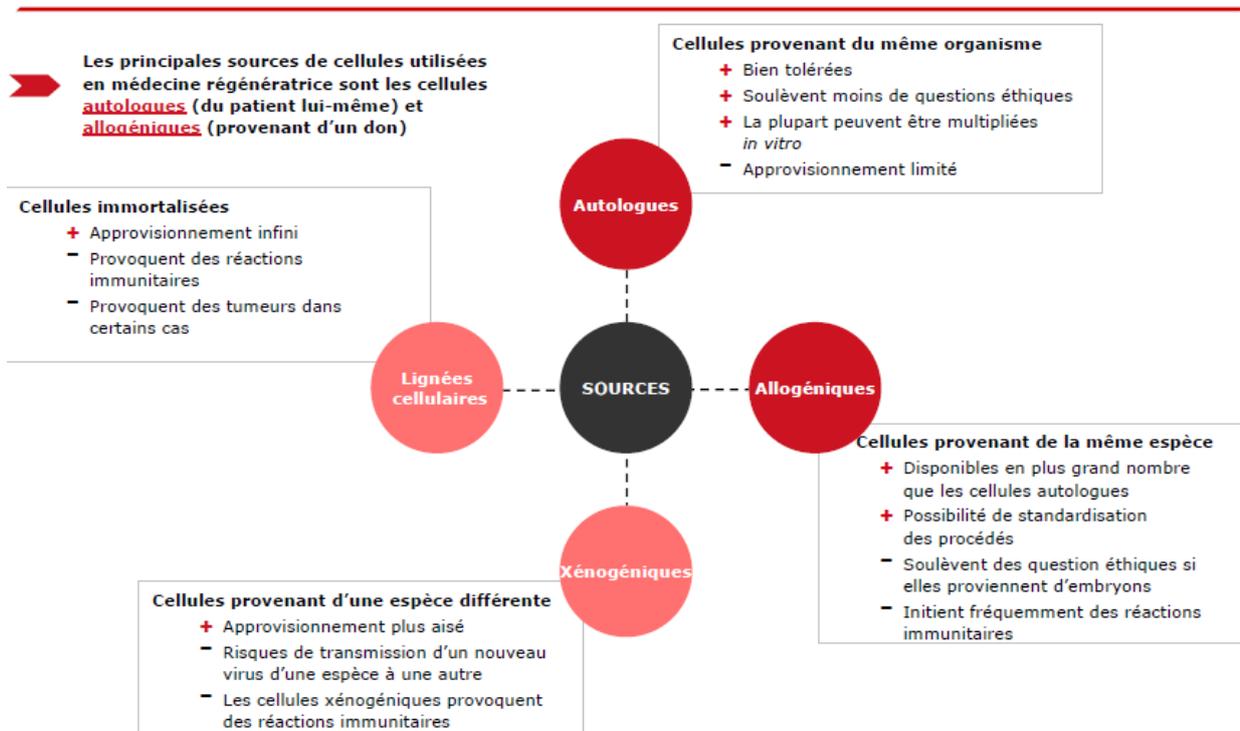


Figure 14 : les quatre sources de cellules souches (Bionest Partner, 2010).

ii. La médecine régénératrice

La thérapie cellulaire a deux principales finalités offrant aujourd'hui de grands espoirs pour le futur : les applications en oncologie et la médecine régénératrice. Le terme de « médecine régénératrice » représente l'utilisation des produits biologiques à des fins de reconstruction de tissus et d'organes. Celle-ci existe depuis plus de 50 ans avec les premières tentatives de greffes d'organes, mais c'est à la fin des années 70 que la thérapie cellulaire marqua fortement la médecine régénératrice, par la première greffe de moelle alors possible par le développement de la biologie cellulaire (Peschanski, 2010).

Aujourd'hui, la médecine régénératrice s'appuie en grande partie sur la thérapie cellulaire, pouvant se substituer à terme aux traditionnelles greffes d'organes. En effet, c'est en s'appuyant sur la culture de cellules souches que l'on peut obtenir un grand nombre de types cellulaires, contrairement à la thérapie cellulaire classique qui utilise des cellules différenciées voire des cellules précurseurs. On verra sûrement dans le futur le développement d'une médecine régénératrice appuyée sur des produits cellulaires industrialisés.

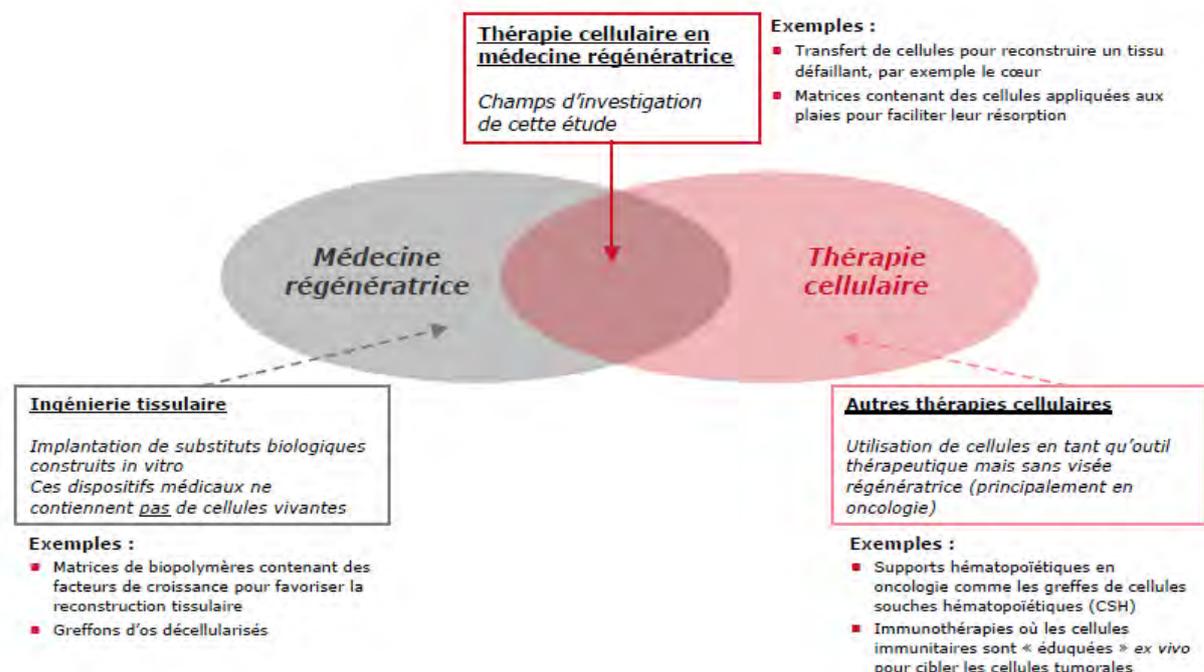


Figure 15 : Recouvrements entre médecine régénératrice et thérapie cellulaire (Bionest Partner, 2010).

Pour bien comprendre ces liens entre thérapie cellulaire et médecine régénératrice, on peut s'aider de ce schéma (figure 15).

b) Les domaines d'application en thérapie cellulaire

Nous allons nous concentrer sur les principales applications en cours, concernant les cellules pluripotentes ES et iPS. Avant cela, voici un bref rappel des différentes phases lors d'un essai clinique (figure 16).



Figure 16 : Les phases des essais cliniques.

La phase préclinique permet de tester une idée et d'évaluer ses effets, soit en laboratoire, soit sur des animaux. Il n'y a pas d'obligation de les publier. La phase clinique, elle, se fait sur l'homme. La phase 1, limitée à un petit nombre de sujets sains, a pour but de tester la molécule sur une courte période, d'évaluer sa sécurité, son devenir dans l'organisme, son seuil de tolérance et ses effets indésirables. La phase II, elle aussi sur un petit nombre de sujets, mais malades, teste l'efficacité du produit et détermine sa dose optimale (posologie). On opère le plus souvent par des études comparatives : un groupe de patient reçoit un placebo tandis que l'autre reçoit la molécule. La phase III est menée sur des milliers de patients afin de comparer l'efficacité thérapeutique de la molécule au traitement de référence (s'il existe) ou à un placebo.



Si les essais démontrent une efficacité supérieure à ce qui est déjà connu, la molécule obtient son AMM (autorisation de mise sur le marché) et peut être commercialisée. Les essais de phase IV ont pour but de détecter les éventuels effets indésirables rares (pharmacovigilance) et d'analyser les interactions médicamenteuses qui existeraient.

i. En neurologie

La moelle épinière, située dans notre colonne vertébrale, est une structure essentielle à nos fonctions sensibles et motrices. Une blessure à la moelle épinière, ou lésion médullaire, peut entraîner la rupture des nerfs reliant le cerveau au corps. Une lésion basse entraîne la paralysie des membres inférieurs uniquement (paraplégie) tandis qu'une lésion haute provoque la paralysie des membres inférieurs et supérieurs (tétraplégie) (figure 17). Selon la gravité de la lésion, d'autres troubles apparaissent, liés au système nerveux autonome : troubles vésicaux, sexuels chez l'homme (dysfonctionnement érectile, anéjaculation), de la commande des organes internes (reflux gastro-oesophagien, ralentissement de l'activité intestinale, vidange rectale manuelle)... Les complications sont nombreuses : escarres, ostéoporose d'inactivité, infections urinaires. Aujourd'hui les principaux traitements visent à diminuer les symptômes (contrôle de la douleur, de la température, de la spasticité, des fonctions respiratoires, rééducation, suivi psychologique et neurologique)...

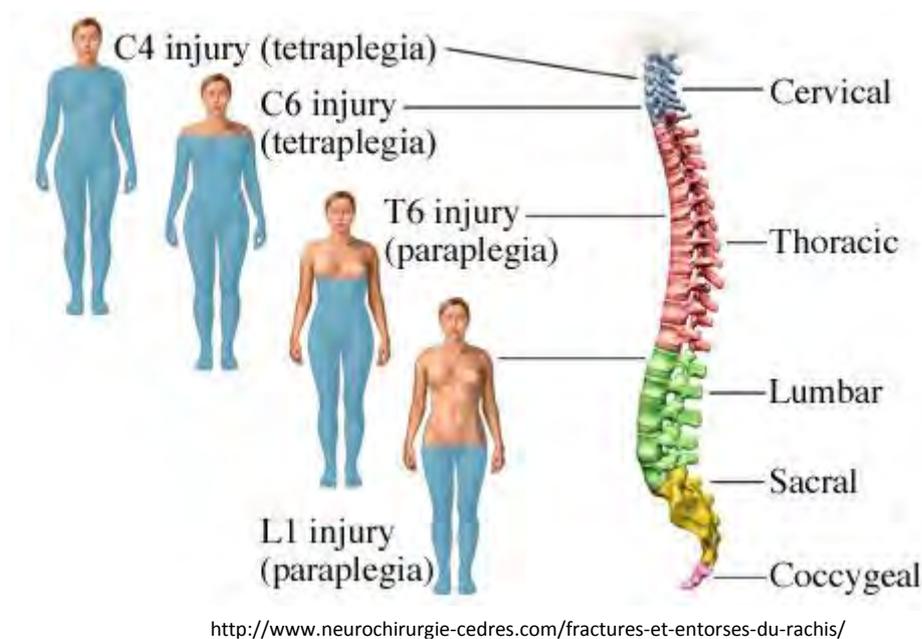


Figure 17 : Différents niveaux des lésions vertébro-médullaires.

C'est à partir de 1998, lorsque les chercheurs Hideyuki, Okano et Steven Goldman mirent en évidence pour la première fois la présence d'une cellule souche neurale progénitrice dans le cerveau humain, que la recherche sur la régénération neurale commença sérieusement (Pincus et al, 1998). Rapidement, on put restaurer la fonction cognitive et la mobilité des rats en utilisant ces cellules souches adultes chez des rats SCI blessés à la moelle épinière (rats

SCI pour Spinal cord injury). Le but était par la suite de transposer les connaissances acquises sur le primate non-humain puis sur l'homme.

Plusieurs essais cliniques furent lancés : par l'équipe de Deda et Kocabay avec des cellules souches autologues hématopoïétiques de moelle osseuse, en 2008 (Deda et al, 2008), ou par Cao et Feng avec des cellules souches ombilicales en janvier 2009 (Cao et Feng, 2009), ou encore avec des cellules souches mésenchymateuses allogéniques par Liang et al en mai 2009 (Liang et al, 2009). Parallèlement à ces essais, l'attrait des cellules souches embryonnaires en séduisit quelques-uns, ce qui peut se comprendre lorsque l'on considère leur pouvoir à fournir un nombre apparemment illimité de cellules souches *in vitro*, leur flexibilité lors de la manipulation et leur capacité de se développer en tout type de cellules.

Ainsi, la FDA (food and drug administration) autorisa le 21 janvier 2009 la première étude mondiale chez l'homme, par la société californienne Geron corporation, leader en recherche sur les cellules ES. L'objectif était de démontrer l'innocuité du produit GRNOPC1, dérivant d'une lignée de cellules ES humaines créée en 2001 et qualifiée (caryotype normal et dénué de contaminants), lors de son injection dans la moelle épinière de 10 patients souffrant de lésions subaiguës complètes (grade A : ni sensibilité ni mouvement au niveau le plus grave, entre les vertèbres thoraciques T3 à T10) de la moelle épinière. Cet essai de phase I visait à obtenir de cette lignée hESC des cellules progénitrices oligodendrocytes OPC, et d'en injecter deux millions dans les 7 jours à 14 jours après l'accident au site de la lésion afin de régénérer la gaine de myéline des cellules nerveuses endommagées (Keirstead et al, 2005).

Les oligodendrocytes sont en effet responsables de la synthèse de la gaine de myéline permettant la conduction des impulsions électriques, ainsi que des facteurs neurotrophiques favorisant la survie et la fonction des neurones. Les patients seraient par la suite contrôlés sur une période de 15 ans, notamment pour s'assurer de l'absence de formation de tératome, de l'absence d'allodynie (douleur déclenchée par un stimulus normalement indolore) et de réponse immunitaire contre les cellules transplantées et de l'efficacité de la transplantation sur les fonctions neurologiques (réactivité des muscles, locomotion, sensations).

Mais en août 2009, la FDA suspendit son autorisation, en attente de données précliniques supplémentaires. En effet, il semblerait que Geron ait affirmé que les 24 études menées sur les souris et les rats avaient été satisfaisantes malgré l'apparition de microkystes au point d'injection des hESC (www.genethique.org). La décision fut prise de continuer les

expériences sur le rat afin de s'assurer de l'innocuité de ces kystes sur une durée minimale d'un an.

Autant l'annonce de la suspension de l'essai fut peu relayée, autant celle de l'autorisation donnée par la FDA en octobre 2010 le fut largement. Geron corporation voulait alors intégrer une dizaine de patient à l'étude, mais elle ne put en suivre que quatre. En effet, face à la crise économique, l'entreprise décida en novembre 2011 d'arrêter cet essai clinique au profit d'autres essais en cours. Le traitement paraissait pourtant être bien toléré (le but n'étant pas de prouver l'efficacité, mais d'en prouver l'innocuité), mais il semblait pour certains qu'à cause de la complexité du type de lésions, les chances de succès de l'étude étaient quasi nulles (Pr. John Martin, professeur de médecine cardiovasculaire au College London).

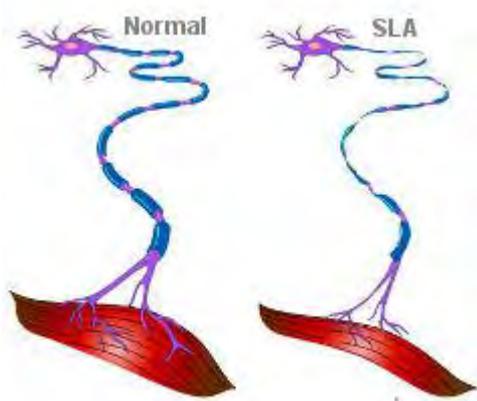


Figure 18 : Impact de la SLA sur les neurones et sur les muscles.

<http://www.psychomedia.qc.ca/sante>

Une alternative aux cellules ES humaines est d'utiliser des cellules iPS. Mais pourrait-on utiliser des cellules souches iPS provenant de n'importe quel donneur, y compris porteur d'une maladie et d'un âge avancé ? C'est la question que se posa l'équipe de Dimos (Dimos et al 2008). Ils testèrent donc trois lignées de cellules iPS obtenues à partir d'une biopsie de peau sur une personne âgée de 82 ans, atteinte de SLA (Sclérose latérale amyotrophique, connue aussi sous le nom de maladie de Lou Gehrig aux Etats-Unis ou maladie de Charcot en France). Au cours de cette

maladie neurodégénérative, le tissu cicatriciel, scléreux, remplace peu à peu les neurones moteurs (ou motoneurones) occupant la partie latérale de la moelle épinière ; s'en suit alors une amyotrophie, une atrophie des muscles normalement commandés par ces neurones (figure 18). Ils comparèrent donc ces cellules iPS aux trois principales caractéristiques des cellules ES humaines : ces deux groupes avaient en commun les marqueurs de surface SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81 et NANOG, un même profil du cycle cellulaire : 35% de cellules en phase S ou G2/M pour les deux groupes, et un même potentiel de pluripotence (formation de corps embryonnaires...). Mais contrairement aux cellules ES, les cellules iPS ne sont pas immunoréactives aux antigènes de la patiente puisqu'elles proviennent de la patiente elle-même (Dimos et al, 2008).

En conclusion, Dimos et al démontrèrent l'incroyable avantage des cellules iPS sur les cellules ES : une immuno-compatibilité totale au patient, quelque soit le patient et sa pathologie, pour une pluripotence égale. Un premier pas vers une application clinique future que ne manqueront pas de saluer tous les patients atteints de lésions médullaires, et plus largement tous les patients nécessitant un recours à la thérapie cellulaire.

Lorsqu'Okano et Yamanaka se penchèrent sur le projet en 2006, l'utilisation des cellules ES humaines n'étaient pas autorisées (elles le sont depuis 2013 au Japon), ils se tournèrent donc naturellement vers les cellules iPS. Ils réussirent ainsi à restaurer la fonction motrice d'une souris SCI en lui injectant tout d'abord des cellules dérivées d'iPSC murines, puis en 2011 des cellules dérivées d'iPSC humaines, et en 2012 c'est à un singe SCI de la famille des marmousets qu'ils transplantèrent ces dernières cellules. Dans tous les cas, les fonctions motrices furent restaurées sans que l'on observe de développement de tumeurs, même après une longue période (un an) (Okano et Yamanaka, 2014).

Toutes les conditions sont réunies pour pouvoir commencer des essais cliniques de phase I, même s'il ne faut pas oublier que les modèles cellulaires ou animaux ne reflètent pas forcément la pathologie humaine. En effet, une simple injection de cellules souches ne suffira pas à réparer les lésions de la moelle épinière tant les circuits reliant les muscles au cerveau sont complexes. Les facteurs contribuant aux dégâts des motoneurones sont si complexes qu'il se pourrait que les cellules saines, une fois transplantées, s'abîment à leur tour. Une combinaison d'approches sera nécessaire afin de viser à la fois 1) les motoneurones du patient, les protéger et soutenir leur croissance, 2) l'environnement, corriger les conditions nuisibles entourant les motoneurones, et 3) les points de connexion entre motoneurones et les muscles eux-mêmes (www.eurostemcell.org). Les deux chercheurs projettent donc de commencer des essais cliniques de phase I, en utilisant tous les atouts disponibles pour traiter les lésions médullaires, c'est-à-dire les cellules iPS mais aussi les antagonistes des inhibiteurs de croissance axonale, tels les inhibiteurs de la sémaphorine 3A. L'avenir nous dira si leur stratégie est la bonne.

ii. En ophtalmologie

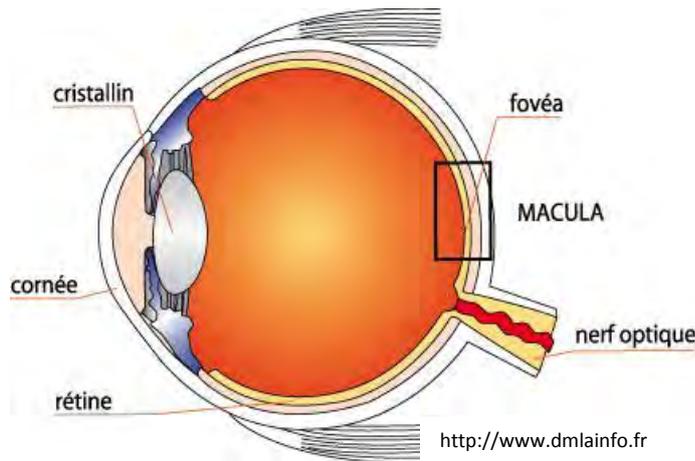


Figure 19 : L'œil

La DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge) et la maladie de Stargardt sont des pathologies d'évolution progressive induisant la diminution continue de l'acuité visuelle liée à une atrophie de la macula. La macula, située au centre de la rétine au fond de l'œil, est constituée uniquement de cônes, des photorécepteurs permettant une bonne acuité

de la vision de jour. Elle transmet 90% de l'information visuelle traitée par le cerveau. En son centre se trouve la fovéa, zone où l'acuité visuelle est la meilleure (figure 18). La **maladie de Stargardt**, d'origine génétique, atteint majoritairement les enfants entre 7 et 12 ans, et se manifeste par une atrophie maculaire et une dégénérescence de l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR), entraînant une perte progressive de la vision centrale sans atteinte de la vision périphérique (vision floue, ondulée, taches...) et une légère perte de la vision des couleurs (www.orpha.net). Elle est multifactorielle, mais le plus souvent due à une mutation du gène ABCA4 provoquant l'accumulation de vitamine A, ne pouvant plus être transportée à l'intérieur des cellules. Il n'existe pas actuellement de traitement curatif, seules quelques aides sont proposées, telles des lunettes grossissantes, loupes, appareils grossissants, verres teintés pour filtrer 100% des UV... La **DMLA** conduit elle aussi à une perte de la vision centrale due à un vieillissement trop rapide de la macula et de l'EPR. Mais dans ce cas, la cause principale n'est pas l'hérédité, mais l'âge : elle se manifeste chez les personnes de plus de 50 ans. Le deuxième facteur de risque reconnu est le tabac (cela multiplie par 4 à 6 le risque de développer la maladie). Les symptômes sont les mêmes que ceux de la maladie de Stargardt. Il existe deux formes de DMLA : la forme sèche ou atrophique, de loin la plus fréquente, évolue lentement mais inéluctablement. Dans de rares cas, elle peut se transformer en forme humide ou exsudative par la formation de néo-vaisseaux dans la choroïde, sous la rétine, gênant la vision. Cette dernière forme est d'évolution particulièrement rapide (quelques semaines) et peut entraîner une perte complète de la vision centrale. Il n'existe aucun traitement pour la forme sèche, et pour la forme humide on tente d'empêcher le développement des néo-vaisseaux (anti-angiogéniques, photothérapie...).

Suite à l'autorisation en 2009 du premier essai clinique avec des cellules embryonnaires pour traiter les lésions médullaires, la FDA donna à nouveau son autorisation en novembre 2010 pour un essai clinique avec des cellules ES humaines de phase I/II : la société ACT (Advanced Cell Technology) visait à tester à la fois l'innocuité et l'efficacité de la thérapie cellulaire sur douze enfants atteints de la maladie de Stargardt. Quelques temps plus tard, le 3 janvier 2011, ACT reçut une nouvelle autorisation de la FDA pour un essai clinique utilisant des cellules ES humaines, mais cette fois-ci pour traiter la forme sèche de la DMLA. Le premier essai clinique utilisant des cellules ES humaines à voir le jour en Europe ne tarda pas : le 22 septembre 2011, l'agence britannique de régulation des médicaments (MHRA) et le Comité de conseil sur la thérapie génique donnèrent leur accord à ACT pour son essai sur la maladie de Stargardt. Les essais (américains et européens) sur la maladie de Stargardt prirent au total douze patients, répartis en quatre groupes de trois patients chacun. On injecta en juillet 2012 50 000 cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR) pures à 99%, dérivées de cellules ES humaines dans l'espace sous-rétinien d'un seul œil de chacun des trois premiers patients. Les trois patients suivants reçurent en novembre 2012 100 000 cellules. Les six patients restants recevront ainsi 150 000 cellules pour le 3^{ème} groupe et 200 000 cellules pour le 4^{ème}. Malgré quelques problèmes financiers en janvier 2014, l'essai s'est poursuivi et devrait prendre fin en décembre 2014. Mais ACT a déjà commencé à diffuser les premiers résultats des greffes effectuées. Ainsi, au cours des quatre premiers mois, aucun signe de prolifération excessive, de tumorigénicité, de développement ectopique ou de rejet manifeste ; un bénéfice fonctionnel a même été observé (Schwartz et al, 2012). Chez les patients atteints de la maladie de Stargardt, la preuve anatomique du succès de la transplantation a même été objectivée : pas de décollement de rétine et une augmentation de la pigmentation au niveau de l'EPR prouvent que les cellules se sont bien fixées à la membrane de Bruch les soutenant, et s'y sont maintenues, au moins le temps du suivi. L'acuité visuelle s'est également améliorée, passant de la perception des mouvements de la main avant traitement, à 20/800 (0,25 dixièmes) à 3 mois (lecture de 0 à 5 lettres sur l'échelle ETDRS). Pour les patients atteints de DMLA, l'acuité, également améliorée, est passée de 0,4 dixièmes à 0,6 dixièmes à 3 mois après l'intervention (lecture de 21 à 28 lettres sur l'échelle ETDRS) (Schwartz et al, 2012). N'oublions pas que le suivi est loin d'être terminé et que de poser des conclusions sur un suivi de seulement 3 mois est bien trop précocement. Les résultats en fin d'année 2014 nous éclaireront davantage sur cette technique, sur son innocuité et son efficacité effective. Le chemin est encore long avant un usage thérapeutique généralisé, et les obstacles nombreux, financiers, éthiques...

Un autre chercheur s'intéressa aussi très tôt à la DMLA (mais cette fois-ci, la DMLA humide) et aux cellules souches comme moyen de traitement : c'est le Dr Masayo Takahashi. Elle appliqua la thérapie pour la première fois en 1998, en transplantant des cellules souches adultes dérivées de cellules neurales progénitrices dans la rétine de souris (M. Takahashi et al, 1998). Mais elle réalisa que ces cellules souches adultes ne pourraient pas se développer suffisamment pour déboucher sur un traitement standard ; aussi se tourna-t-elle vers les cellules souches ES.

Six ans plus tard, elle publia avec Masatoshi Haruta un article démontrant que les cellules épithéliales pigmentaires dérivées de cellules souches ES possédaient les mêmes propriétés morphologiques et physiologiques que des cellules de l'EPR normales (Haruta et al, 2004). Ce fut le premier modèle animal traité par des cellules ES de primates. Pourtant, elle hésitait à appliquer la thérapie sur l'homme, car cela aurait nécessité un traitement immunodépresseur, ce qui n'est pas sans risque chez des patients âgés. Son choix se porta donc dès 2005 sur les souches iPS, et elle débuta des études précliniques avec des cellules iPS humaines en 2007. Les résultats de ces études furent publiés (ce qui n'est pas une obligation pour des études pré-cliniques) tout récemment, en janvier 2014 : après la transplantation d'un million de cellules de l'EPR dérivées d'iPSC humaines en sous-cutané à 65 souris immunodéficientes, et la transplantation sous-rétinale de 10 000 cellules de l'EPR dérivées d'iPSC humaines à 26 rats immunodéficients, aucune tumeur n'a été observée après 6 à 15 mois de suivi. En considérant le nombre de rongeurs utilisés, la durée du suivi et la sensibilité de la méthode à détecter des tumeurs, l'équipe a pu conclure que le risque de formation de tumeur après transplantation de cellules de l'EPR dérivées d'iPSC humaines est négligeable (Kanemura et al, 2014). Ces études précliniques très encourageantes ouvrent donc la voie à des essais cliniques chez l'homme. C'est ce que Takahashi a l'intention de commencer dès maintenant, mais sous forme d'une « étude clinique », qui est un système propre au Japon. Un essai clinique permet d'établir un traitement standard, tandis qu'une « étude clinique » débouche sur une « thérapie avancée » (cette procédure est moins onéreuse). Comme un essai de phase I, il ne démontrera pas l'efficacité, mais l'innocuité de la méthode, par un test de tumorigénicité de chaque lignée de cellules iPS, sévèrement choisies par leurs gènes, morphologie, marqueurs cellulaires et caryotype (www.ipscell.com). Le but est de remplacer la section endommagée de l'EPR par des cellules créées à partir d'une biopsie de peau du bras du patient atteint de DMLA sèche. Takahashi est très confiante sur la réussite de son projet : grâce aux résultats précliniques sur les animaux, mais aussi parce que grâce au pigment brun

des cellules RPE, il suffit de bien sélectionner les amas de cellules RPE brunes pures afin d'éviter d'injecter des cellules provoquant la formation de tumeur. De plus, il est facile de suivre l'évolution de la greffe au travers de la pupille dilatée du patient.

Si la méthode ne coûtait pas aussi cher, il n'y aurait décidément que des avantages à l'utiliser. En effet, chaque chirurgie coûte 200 000\$ par œil et nécessite dix personnes par an. Pour qu'un traitement devienne standard, il faut que le coût décroisse, ce qui n'est pas le cas aujourd'hui des greffes autologues. Il faudra donc à l'avenir trouver des moyens de diminuer le coût des greffes autologues, ou bien opérer des greffes allogéniques.

Pour cela, le Pr Yamanaka prévoit de créer une banque de cellules iPS pour stocker un certain nombre de cellules iPS de caractéristiques les plus courantes (celles qui sont les plus susceptibles d'être intégrées chez un patient sans qu'elles ne soient rejetées). Il reste que la principale difficulté avec les cellules souches iPS est d'obtenir des quantités croissantes de cellules pour traiter des pathologies touchant d'autres organes que l'œil ; ce qui prendrait bien plus de temps.

iii. En cardiologie

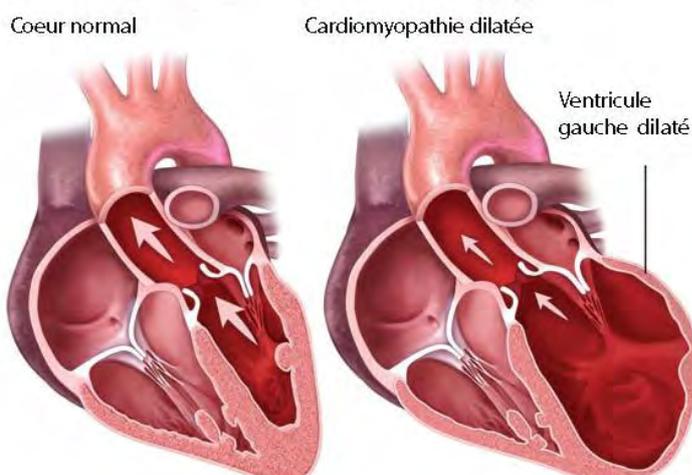


Figure 20 : la morphologie du cœur est modifiée par rapport à la normale lorsqu'il est en situation d'insuffisance cardiaque.

Après un infarctus, une partie du muscle cardiaque est endommagée, le cœur a moins de force pour expulser le sang dans les artères et répondre aux besoins du corps en oxygène et nutriments : c'est ce qu'on appelle **l'insuffisance cardiaque**.

L'insuffisance cardiaque peut avoir de nombreuses origines, outre l'infarctus : hypertension, troubles du rythme, maladie des valves cardiaques, dystrophies musculaires génétiques... Au début, le cœur tente de répondre à ce manque d'oxygène en accélérant ses battements, puis il augmente de volume (ses parois s'épaississent ou les cavités

se dilatent), ce qui finit par aggraver la maladie (figure 20). Les traitements médicamenteux existent, en complément des règles hygiéno-diététiques, mais elles peuvent ne pas être suffisantes. Une fois endommagé, le cœur d'un adulte humain ne peut pas guérir complètement ; la seule option restante est la transplantation cardiaque, une opération lourde et peu fréquente à cause de la pénurie de greffons. C'est pourquoi depuis 10 ans les chercheurs tentent de remplacer les cellules cardiaques détruites par des cellules contractiles viables provenant de cellules souches.

Les premiers essais sur le rat utilisèrent des cellules souches musculaires. Les résultats furent prometteurs, et en 2000, l'équipe de Philippe Menasché lança le premier essai clinique ouvrant la voie à la thérapie cellulaire cardiaque (Menasché et Hagège, 2000). Les cellules souches étaient prélevées dans la cuisse du patient lui-même, un avantage certain puisqu'il s'agit d'éviter tout rejet auto-immun. La phase I ayant démontré l'innocuité de l'injection de cellules souches musculaires directement dans le cœur, on passa en 2002 à la phase II afin d'évaluer son efficacité sur 97 patients. Mais les résultats furent décevants : la greffe ne démontra pas d'amélioration de la fonction cardiaque (Menasché et al, 2008). Les cellules greffées ne se transformeraient apparemment pas en cellules contractiles dans le cœur et disparaîtraient même. Il fallait donc se tourner vers un autre type de cellules souches.

Une étude suggérait que les cellules souches de la moelle osseuse amélioreraient la fonction cardiaque en formant de nouveaux cardiomyocytes, une fois injectées dans un cœur défaillant de souris (Orlic et al, 2001). Mais il est désormais bien établi que les cellules de moelle osseuse ne peuvent se transformer en cardiomyocytes ; elles favoriseraient la fonction cardiaque plutôt en sécrétant des facteurs de croissance. L'essai clinique BONAMI de phase II a été ainsi lancé en 2009 : 3 mois après l'injection il n'y a pas eu d'amélioration significative de la contractilité (mesurée par la fraction d'éjection), mais une amélioration de la viabilité du muscle cardiaque (Roncalli et Lemarchand, 2011). Enfin, un autre essai clinique fut publié par l'équipe de Roberto Bolli en 2011 sur l'injection de cellules souches cardiaques à 16 patients souffrant d'insuffisance cardiaque sévère : chez 8 d'entre eux la contractilité du cœur (sa fraction d'éjection) avait regagné 12% (Bolli et al, 2011), ce qui est encourageant mais pas suffisant pour enthousiasmer la communauté scientifique.

Philippe Menasché décida alors d'explorer une nouvelle piste : les cellules souches embryonnaires. En 2002, Michel Pucéat avait réussi à soigner le cœur défaillant de rats : il commençait par cultiver des cellules ES murines avec les facteurs de croissance TGF-beta et

BMP2, elles se différencient alors en progéniteurs cardiaques qui, injectés dans le cœur des rats, achevaient leur évolution en cellules contractiles (Behfar et al, 2002). La collaboration des deux chercheurs Philippe Menasché et Michel Pucéat commença en 2004, l'année de la révision des lois de bioéthique autorisant par dérogation l'utilisation des cellules ES humaines : ils furent les premiers en France à obtenir cette autorisation. En testant l'injection de cellules ES humaines sur la souris puis sur le macaque rhésus, ils tentèrent d'améliorer leur méthode en limitant au maximum le risque de formation tumorale -le principal risque- par le tri qualitatif des cellules injectées (notamment par l'identification de marqueurs de surface) (Tomescot et al, 2007). Mais les risques sont nombreux, et avant de passer aux études cliniques sur l'homme, il leur faut transformer un produit de laboratoire en potentiel outil thérapeutique, selon les pratiques reproductibles et autorisées par l'ANSM : les BPF (bonnes pratiques de fabrication). Chaque étape de différenciation et de sélection se caractérise par une batterie de tests dans le but d'écarter tout risque : risque infectieux dû à une bactérie ou un virus, risque de dysfonctionnement dû à des remaniements chromosomiques ou une perte de matériel génétique, risque de tératome... L'équipe est donc entrée en collaboration avec la société de biotechnologies Mabgène possédant 600 millions de cellules ES humaines respectant les BPF. Un essai clinique fut lancé sur six patients atteints d'une insuffisance cardiaque sévère (fraction d'éjection du ventricule gauche $\leq 35\%$ (la moyenne étant autour de 50%), infarctus du myocarde datant de plus de six mois, candidats à un pontage coronaire ou à une intervention sur la valve mitrale...) selon ce protocole (Menasché et al, 2014) :

- cellules ES préparées selon les BPF
- le facteur de croissance BMP2 induisant la différenciation en cellules progénitrices cardiaques
- la sélection par un tri immuno-magnétique des cellules SSEA-1 positives (spécifiques aux cellules ES) et des cellules synthétisant le facteur de transcription Isl-1 (spécifique aux cellules cardiaques)
- le dépôt de ces cellules sur un patch de fibrine qui sera greffé chirurgicalement sur la zone de l'infarctus (permet une meilleure pénétration des cellules qu'une injection)
- une analyse de la sécurité ciblée sur la perte du risque cancérogène, *in vitro* (analyse transcriptomique) et *in vivo* (injection des cellules dans des souris immunodéficientes) ainsi qu'un large test cytogénétique et viral
- la caractérisation du produit cellulaire final

Il y aura toujours des améliorations à apporter, mais ces données sont une bonne base pour une future application thérapeutique des cellules ES humaines en cardiologie, dans des conditions d'innocuité et de BPF efficaces. *Le Généraliste* du 10 juin 2014 a annoncé tout récemment que l'ANSM vient de donner son feu vert à l'essai clinique du Pr Menasché, qui démarrera sur 6 patients.

Concernant les cellules iPS humaines, on les utilise aujourd'hui en cardiologie davantage pour la modélisation de pathologies et le screening de molécules. Dans le domaine des essais cliniques, elles n'en sont encore qu'au stade pré-clinique. Nous pouvons citer par exemple la publication de l'équipe de Miao en mai 2014, qui démontra que les cellules souches mésenchymateuses humaines dérivées de cellules iPS améliorent le remodelage ventriculaire et préservent la pression myocardique globale. Ces cellules renforcent la néo-angiogénèse et favorisent la déformation myocardique via le parenchyme et les interactions entre cellules interstitielles dans le myocarde touché (Miao et al, 2014). Il faudra probablement attendre encore un peu avant de mettre au point des méthodes sûres avec les cellules iPS et qu'un essai clinique sur l'homme ne soit lancé, puisque le cœur nécessite une greffe bien plus importante (en nombre de cellules injectées) et complexe (les cellules doivent se contracter de manière synchrone) que ce que nous avons vu lors de la greffe de cellules de l'épithélium rétinien.

c) Autres domaines d'application

Les perspectives cliniques des cellules pluripotentes sont bien plus larges que celles des cellules multipotentes, justement par leur potence, c'est-à-dire leur capacité de différenciation plus large. Mais à cause de cela, elles sont plus difficiles à manier, et le risque de formation de tumeur est plus élevé. Une grande prudence s'impose, et c'est pour cela que très peu d'essais cliniques sur l'homme ont été lancés. Nous avons vu les quatre essais cliniques aujourd'hui en cours. Les cellules souches ES et iPS trouveront leur utilité dans de nombreuses autres pathologies, comme la chorée de Huntington, la mucoviscidose, la génodermatose de Houston, l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive, la maladie de Steinert, l'insuffisance hépatique, le diabète, les cancers, l'incontinence urinaire... Nous allons voir quelques-unes de ces indications, où en sont les recherches, qu'est-ce qui est déjà possible, et quels sont les espoirs.

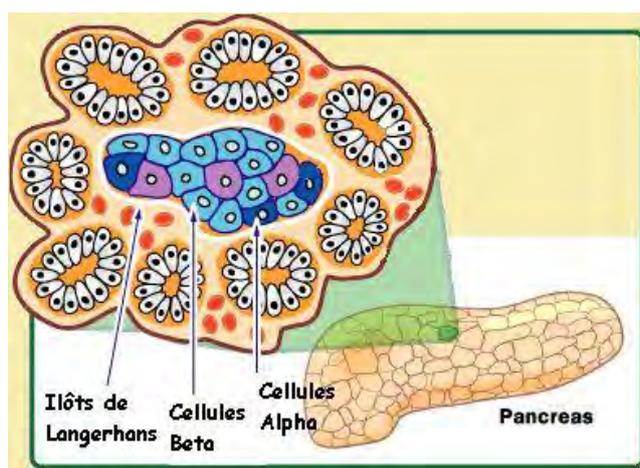


Figure 21 : Structure du pancréas

Le diabète de type I est une maladie auto-immune dans laquelle le système immunitaire s'attaque aux cellules β des îlots de Langerhans du pancréas productrices d'insuline (figure 21). Des traitements permettant de réguler la glycémie existent, mais aucun traitement curatif n'a encore vu le jour. On peut certes proposer une greffe de pancréas ou d'îlots de Langerhans, mais le risque de

rejet est élevé et le traitement immunosuppresseur reste lourd. Une autre voie en cours de recherche est de stimuler la fabrication de cellules β par le pancréas lui-même, en activant le gène Pax4 au lieu de Arx dans les cellules α , ce qui les transforme en véritables cellules β . Cette méthode a été testée avec succès en juillet 2013 chez des souris (Al-Hasani, Collombat et al, 2013). D'autres équipes, comme celle de la société ViaCyte (anciennement Novocell), se sont penchées sur l'utilisation de cellules ES humaines différenciées en progéniteurs pancréatiques, qu'ils encapsulent afin de laisser la maturation se poursuivre *in vivo* avant de les injecter au patient (Schulz, Robins et al, 2012). La différenciation de ces hESC en progéniteurs pancréatiques a été obtenue avec succès. Les essais précliniques sur la souris et le rat aussi donnent également des résultats satisfaisants. Il ne reste plus qu'à commencer les

essais chez l'homme. Mais avant cela, et afin d'obtenir l'approbation des autorités compétentes pour l'utilisation de ces produits sur l'homme, il faudra améliorer les méthodes de « fabrication » et les tests requis pour assurer l'efficacité et la sûreté exigées, sans risque de formation de tératomes ni de rejet immun. Il y a encore du travail. Afin de diminuer le premier risque, une purification des cellules obtenues est indispensable pour prouver leur spécificité de progéniteur pancréatique. Les scientifiques tentent de contourner le problème du rejet immun en encapsulant les progéniteurs, ou bien ils se tourneront vers les cellules iPS. Un dernier écueil subsiste encore : les données suggèrent qu'une amplification continue des progéniteurs pancréatiques *in vitro* entraînerait une perte des capacités endocrines, après transplantation (Sui et al, 2013). Concernant les cellules iPS, la recherche n'en est encore qu'à ses débuts.

En dermatologie, c'est l'équipe de Christine Baldeschi de l'institut I-STEM dirigée par Marc Peschanski, qui fut la première, en novembre 2009, à avoir réussi à transformer des cellules ES humaines en une population pure et homogène de kératinocytes, par la culture de ces cellules en présence d'une forte concentration de BMP4 pendant 40 jours. Le procédé fonctionne puisque ces kératinocytes sont capables de reconstituer un épiderme pluristratifié entier en 10 jours *in vitro* ou en 12 semaines après une greffe *in vivo* chez la souris (Guenou, Peschanski, Baldeschi et al, 2009) (figure 20). L'étape suivante fut franchie en 2011,

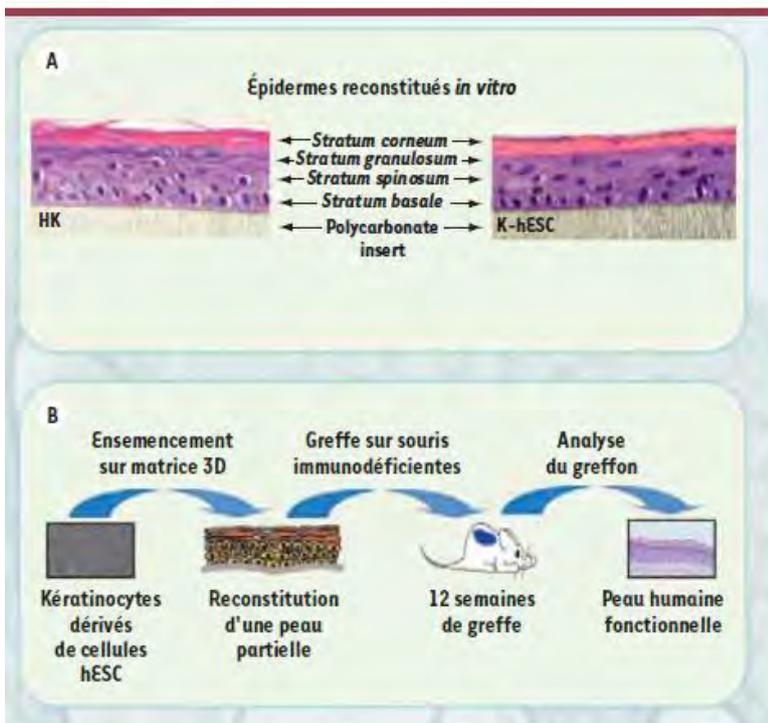


Figure 20. Des kératinocytes adultes (HK) et des K-hESC ont ainsi été ensemencés en parallèle sur des matrices de polycarbonate. Après une première phase d'expansion de 48h les cellules ont été placées à l'interface air/liquide afin d'infuire leur stratifications (A). Deux semaines plus tard, la coloration hématoxyline-éosine montre que les cellules K-hES sont capables de stratifier pour former l'ensemble des couches de l'épiderme (A). Des épidermes construits *in vitro* à partir de K-hESC ont été greffés chez des souris immunodéficientes (B) après avoir été ensemencés sur une matrice tridimensionnelle. Quatre mois plus tard, l'analyse de la xénogreffe confirme la présence d'une peau artificielle humaine fonctionnelle.

Figure 22 : Construction d'un épiderme pluristratifié fonctionnel à partir de kératinocytes dérivés de hESC *in vitro* et *in vivo* (Nissan et al, 2010).

lorsqu'ils réussirent à obtenir des mélanocytes fonctionnels *in vitro*. De nombreux essais sur les animaux devront avoir lieu avant de débiter les essais cliniques sur l'homme, dans quelques années. Ces travaux pourront alors avoir de multiples applications : l'épiderme reconstitué pourrait servir de pansement biologique chez les grands brûlés, chez les personnes atteintes d'épidermolyse bulleuse ou d'ulcères chroniques de la jambe (diabète, drépanocytose), et la présence de mélanocytes élargit le champ d'application aux patients atteints de troubles de la pigmentation de la peau : vitiligo, syndrome de Griscelli, de Waardenburg...A terme, l'objectif serait de créer une banque de cellules à disposition des médecins, ce qui permettrait d'avoir les cellules nécessaires à la greffe immédiatement disponibles. Mais ces perspectives ne tiennent pas en compte la réalité éthique défavorable qui pèse sur l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines. Rappelons qu'en 2009, les professeurs Wagner et Lataillade ont permis chacun le traitement d'affections de la peau (épidermolyse bulleuse pour le Pr John Wagner, grands brûlés pour le Pr Jean-Jacques Lataillade) à partir de cellules souches adultes différenciées en kératinocytes. Ces résultats ont déjà des applications cliniques humaines. Les techniques auront beau évoluer, l'origine de ces cellules ES (par la destruction d'un embryon humain) ne changera pas. La prouesse technique qu'est l'utilisation de cellules embryonnaires ne peut suffire, surtout quand cela n'apporte rien de nouveau sur le plan clinique. Il leur faudra tout d'abord obtenir l'autorisation du comité d'éthique avant de poursuivre leurs travaux. En 2011, l'équipe de Itoh réussirent à générer des cellules iPS à partir de fibroblastes de patients présentant une épidermolyse bulleuse dystrophique récessive (EBDR), à les différencier ensuite en kératinocytes et à synthétiser à partir de celles-ci des équivalents de peau en 3D (Itoh et al, 2011). La différenciation s'est faite en présence de BMP4 afin de bloquer la voie de différenciation neurale, et d'acide rétinoïque pour promouvoir la différenciation vers la voie ectodermique. Les essais cliniques sont loin d'être mis en place, mais c'est un premier pas encourageant pour une future construction de peau complète à partir d'une simple biopsie de peau.

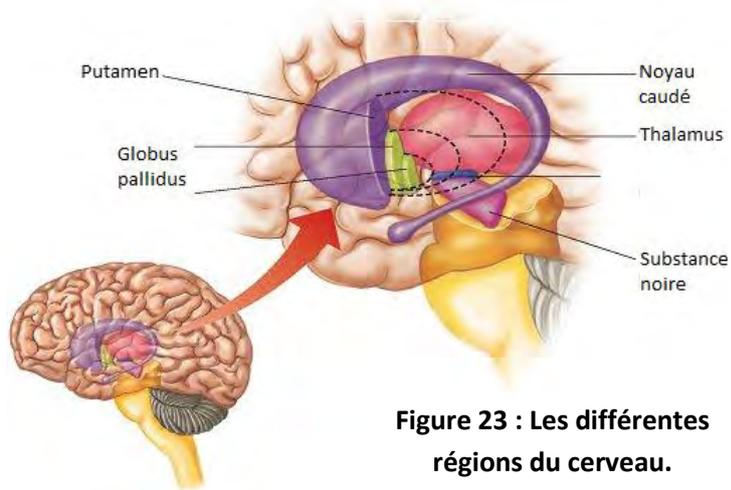


Figure 23 : Les différentes régions du cerveau.

Les pathologies neurologiques se divisent en deux catégories : les maladies neuro-dégénératives et les lésions aiguës. Nous avons déjà parlé de ces dernières plus haut. Dans les pathologies neurodégénératives, il existe deux cas plus « simples » pour la médecine régénérative car les neurones touchés sont bien

localisés : la maladie de Parkinson et la chorée de Huntington, toutes deux d'étiologie mal connue et sans traitement curatif existant à ce jour. La maladie de Parkinson est due à la destruction progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire projetant leurs axones au niveau des noyaux caudés et du putamen (figure 23). C'est pourquoi les premiers essais cliniques débutés dans les années 1990 utilisèrent du tissu cérébral fœtal contenant les futurs neurones dopaminergiques du cerveau : les patients survécurent plus de 10 ans après la transplantation (Piccini et al, 1999 ; Björklund et al, 2003). Mais les ressources en tissu fœtal reste problématiques, puisqu'il faut de six à dix fœtus pour un transplant, et cela n'est pas non plus dénué d'objections éthiques. L'équipe de Lorenz Studer s'intéressa donc à son tour aux cellules ES humaines pour modéliser la maladie de Parkinson et comprendre son fonctionnement. Les premiers essais précliniques sur le rat et la souris furent opérés, puis chez le singe (Doi et al, 2012). Aucun essai clinique avec ces hESC n'a été à ce jour initié. Quand à l'équipe de Jun Takahashi, elle pense pouvoir débuter les préparatifs pour des essais cliniques courant 2015 et les premières greffes de cellules progénitrices sécrétrices de dopamine dérivées de cellules iPS à l'horizon 2016.

Ces travaux ouvrirent la voie aux recherches sur la chorée de Huntington. Cette autre maladie neurodégénérative, d'origine génétique, se manifeste par une destruction du striatum (noyau caudé et putamen, figure 23) et de ses neurones épineux moyens (MSN), très probablement due à un nombre de répétitions de la séquence CAG supérieur à 35 sur le gène de la Huntingtine, entraînant une perte des fonctions cognitives et motrices du patient. Les premières tentatives débutèrent dès 1998, lorsque les équipes des Pr Peschanski (Inserm) et Hantraye (CEA) greffèrent des neurones obtenus à partir de fœtus avortés à des primates malades, et deux ans plus tard, ces neuroblastes fœtaux furent greffés sur cinq patients

d'abord au striatum droit, et l'année d'après au striatum gauche (Bachoud-Levi et al, 2000). Mais vu la source d'approvisionnement limitée que représentent les fœtus avortés, il fallait une alternative, que l'on trouva dans les cellules ES humaines. L'équipe d'Anselme Perrier mit ainsi au point en 2008 un protocole différenciant les cellules hES en progéniteurs et en neurones du striatum, qu'elle greffa chez le rat présentant des lésions similaires à la maladie de Huntington chez l'homme (Aubry, Perrier et al, 2008). Le premier essai clinique lancé sur l'homme concernait pourtant des cellules souches adultes : les cellules souches mésenchymateuses, en 2012, par l'institut CIRM (California institute for regenerative medicine). En présence de cette alternative, l'autorisation d'essais avec des cellules ES humaines se fait attendre. Peut-être la préférence sera-t-elle donnée aux cellules iPS dans quelques années, lorsqu'on les connaîtra un peu mieux ? Mais pour l'instant, on ne les utilise que pour modéliser ces maladies chez les rongeurs.

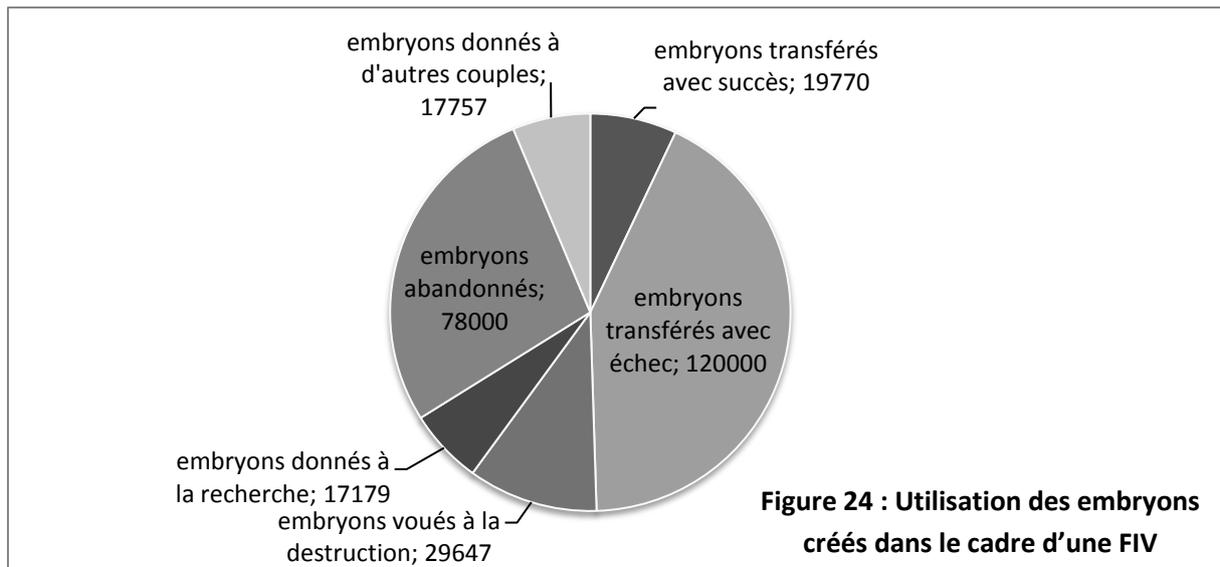
B. Comparaison entre les différents types de cellules pluripotentes

Les cellules iPS ont-elles les mêmes caractéristiques que les cellules ES ? Cette question a suscité et suscite encore de vifs débats parmi les scientifiques. Nous allons dans cette partie tenter de donner des réponses, concernant leur pluripotence, leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation. Nous verrons s'il est possible d'utiliser indifféremment ces deux types de cellules lors du criblage de molécules et en modélisation, et si elles ont le même coût. Enfin, nous terminerons par les deux points qui ont le plus intéressé les scientifiques : celui de l'immunogénicité et celui des considérations éthiques.

1) Comparaison des sources de cellules souches pluripotentes

Le premier avantage des cellules ES et iPS humaines sur les cellules souches adultes reconnu unanimement est leur facilité de prélèvement et leur source largement disponible. Pour les iPSC, il suffit d'une simple biopsie de peau de n'importe quel donneur, la source de cellules est donc totalement illimitée. Pour les ESC, il faut un embryon, que l'on récupère lorsqu'un couple ayant demandé une FIV n'a plus de projet parental sur cet embryon. En 2011, 282 353 embryons ont été conçus par FIV. Parmi eux, près de la moitié ont été transférés in utéro, donnant naissance à 19 770 enfants, soit 7% des 282 353 embryons prélevés. Les embryons restant (l'autre moitié) ne seront jamais transférés : 12% seront donnés à d'autres couples, 21% seront voués à la destruction, et 11% seulement des parents donneront leurs embryons à la science. Les 56% restants seront abandonnés, sans réponse de la part des parents, et ces embryons sont un dilemme pour les responsables des CECOS. Ainsi, au 31 décembre 2010, 17 179 embryons dépourvus de projet parental avaient fait l'objet d'un consentement à leur utilisation en recherche (source : Agence de la biomédecine) (figure 24).

Sur les 51 protocoles de recherche autorisés de 2004 à 2010, 11 protocoles ont utilisés 1087 embryons, et 40 protocoles ont utilisé des lignées de hESC importées. Ainsi donc, la source d'hESC n'est pas limitée mais est largement suffisante aujourd'hui et pour encore longtemps. On peut se demander si à force de développer les thérapies utilisant les ESC humaines, la demande dépassera l'offre et si la création d'embryons aux seules fins de la recherche deviendra incontournable. Cela reste interdit aujourd'hui, afin de ne pas commercialiser ni réifier l'embryon.



Il est important pour l'avenir de s'assurer de la reproductibilité des protocoles et de la similarité des lignées cellulaires obtenues, pour une future transposition à l'industrie. Les protocoles visant à obtenir des cellules iPS sont variés : nous avons le choix des cellules d'origine, des facteurs de reprogrammation, des vecteurs d'insertion... mais globalement, pour un même protocole, les lignées de cellules iPS sont quasiment identiques. Cette bonne reproductibilité est un atout pour une utilisation industrielle. Ce n'est pas encore vraiment le cas pour les cellules ES : malgré un protocole défini, on constate une variabilité entre les différentes lignées de cellules ES obtenues, que ce soit dans leur potentiel ou leur profil transcriptionnel (avec parfois des variations d'expression de transcrits atteignant un facteur $>10^3$ (Osafune et al, 2008). C'est un problème dans le cadre d'une thérapie autologue, puisque cela signifie évaluer plusieurs lignées pour chaque patient avant toute thérapie. Il faut donc continuer à fournir des efforts afin d'améliorer les techniques de passage. Le transfert mécanique conduit à de moins importantes variabilités, mais son application à grande échelle est impossible car elle est laborieuse et chronophage (voir tableau I, premier chapitre, B-2c). Le transfert enzymatique, plus simple et plus rapide, donne malheureusement des colonies plus hétérogènes.

2) Comparaison des pluripotences

Dès le moment de la fécondation, les cellules appartenant à la morula sont totalement totipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier dans les trois types de feuillets embryonnaires : endoderme, ectoderme, mésoderme, ainsi que se différencier en tissus extra-

embryonnaires. La potence des cellules se restreint tout au long du développement embryonnaire, jusqu'au stade adulte. Les cellules ES sont issues de l'ICM entre les 5^{ème} et 7^{ème} jours après la fécondation. Ces cellules sont donc potentiellement pluripotentes. Il faut pourtant s'en assurer, ce qui n'est pas simple, car les critères définissant la pluripotence d'une cellule sont multiples et inégaux. Les cellules ES possèdent au moins 3 critères de pluripotence. Tout d'abord, les cellules ES portent bien les marqueurs de surface de la pluripotence : les marqueurs des facteurs de transcription Oct4, Sox3 et Nanog, les antigènes de surface SSEA-4, SSEA-3, TRA-1-60 et TRA-1-81, ainsi que les enzymes télomérase et phosphatase alcaline. Ensuite, ces cellules, cultivées *in vitro*, forment effectivement des corps embryoïdes pouvant se différencier en n'importe quelle cellule des trois feuilletts embryonnaires, et cultivées *in vivo* dans des sujets immuno-déficients, elles forment des tératomes. Les 3 critères suivants sont la formation d'un individu entier viable et fertile, la formation de chimères post-natales fertiles, et le meilleur des tests de pluripotence : « la complémentation tétraploïde », que l'on obtient en implantant dans l'utérus d'une femelle les cellules à tester fusionnées avec des embryons tétraploïdes. Ces derniers critères sont évidemment impossibles à valider chez l'homme, et on doit se contenter des 3 premiers critères pour affirmer la pluripotence des cellules ES humaines (tableau VI).

Tableau VI : Différents critères utilisés pour juger de la pluripotence d'une cellule (Coulombel, 2009) Les critères sont classés dans un ordre hiérarchique allant du moins exigeant (à gauche) au plus rigoureux (à droite).

	Critères de stringence croissante →					
	Différenciation <i>In vitro</i>	Expression signature moléculaire*	Formation tératome	Chimère post-natale	Transmission germinale	Complémentation hôte 4n
miPS	■	■	■	■	■	■
mSCNT	■	■	■	■	■	■
hCSE (masse interne)	■	■	■	???	???	???
hiPS	■	■	■	???	???	???

■ succès
 ??? expériences irréalisables

Ce qui n'est bien sûr pas suffisant, puisque l'on note que l'efficacité de l'obtention de lignées de hESC à partir de l'ICM est loin d'être totale : de 6 à 50% d'embryons permettent la formation effective de lignées hESC. Chen et al. déterminèrent que le moment où l'efficacité est la meilleure (aux alentours de 50%) est au 6^{ème} jour après la fécondation, soit une efficacité dix fois meilleure que lorsque le prélèvement est fait au 5^{ème} jour (Chen et al, 2009).

Concernant les cellules iPS, leur pluripotence fut moins évidente à démontrer. Les essais de complémentation d'embryons tétraploïdes de souris échouèrent pendant quelques temps, les embryons ne dépassant pas le stade embryonnaire $\epsilon 15$ et ne donnant pas de souriceaux viables. Mais à force de persévérance et en modifiant à peine le protocole de reprogrammation (changement du marqueur de sélection qui était utilisé), plusieurs équipes réussirent à faire naître des souriceaux dont la totalité des tissus provenait de cellules iPS. Il est aujourd'hui bien démontré que les cellules iPS murines sont pluripotentes, par leur capacité à former des individus chimériques viables et fertiles, et par la complémentation tétraploïde (Zhao et al, 2009). Concernant les cellules iPS humaines, tout comme pour les hESC, on les qualifie de « pluripotentes » en se basant uniquement sur leur capacité à se différencier dans les 3 feuilletts embryonnaires, à exprimer les marqueurs de la pluripotence, et à former des tératomes (tableau VI). Les marqueurs de surface des iPSC sont à peu de choses près les mêmes que pour les ESC : Oct4, Sox3 et Nanog, SSEA-4, SSEA-3, TRA-1-60 et TRA-1-81, ainsi que les enzymes télomérase et phosphatase alcaline. Maintenant que l'on a un peu plus de recul sur ces cellules, on peut penser que la difficulté rencontrée à obtenir des cellules pluripotentes est due à l'existence de cellules incomplètement reprogrammées. Certaines cellules « pré-iPS » s'arrêtent sur le chemin de la reprogrammation et ne sont donc capables de contribuer qu'à un chimérisme mais sans transmission germinale, tandis que d'autres cellules vont au bout de la reprogrammation et retrouvent un potentiel proche de celui des cellules embryonnaires très précoces (figure 25). Cette reprogrammation complète ne se faisant pas spontanément, une petite aide est la bienvenue, sous forme d'inhibiteurs de voies de signalisation décrites comme essentielles au maintien de l'auto-renouvellement des cellules ESC (Coulombel, 2009).

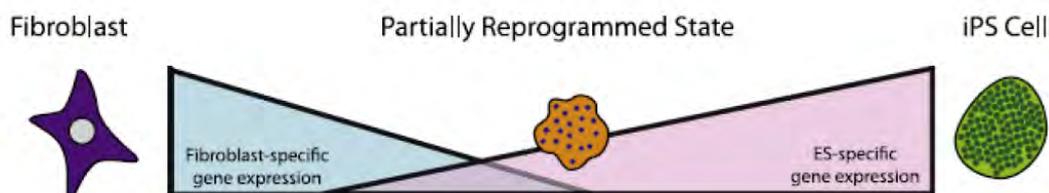


Figure 25 : La reprogrammation incomplète des cellules iPS (Laustriat, 2010)

Il est donc communément reconnu aujourd'hui que les hESC et les hiPS possèdent un même degré de potence : la pluripotence, supérieure à la multipotence de toutes les cellules souches adultes. Toutefois, l'efficacité de la méthode est moindre pour les cellules iPS : moins de 1% des fibroblastes transfectés deviennent des cellules iPS. Des efforts sont

encore à fournir de ce côté-là, mais même ce faible taux est déjà bien, puisque l'obtention d'une unique cellule souche pluripotente est suffisante pour former une lignée. Le tri des cellules après reprogrammation est donc une étape indispensable, afin de séparer les cellules reprogrammées des cellules non ou partiellement reprogrammées.

3) Comparaison de l'auto-renouvellement

Une deuxième propriété fondamentale des cellules souches est leur capacité de s'auto-renouveler à l'infini *in vitro* (un très grand nombre de fois *in vivo*). Dans les deux cas, ESC et iPS, la possibilité de former des tumeurs (proliférations illimitées et anormales de cellules) atteste de leur propriété d'auto-renouvellement. Une des plus préoccupantes contraintes aujourd'hui est l'instabilité du programme génétique. Pour les ESC comme pour les iPSC, lorsque l'on repique plusieurs fois les cellules pour en obtenir une grande quantité à partir d'une unique cellule, on les expose à des traitements agressifs de cellules adhérentes : ce sont les cellules ayant des altérations génomiques procurant un avantage prolifératif qui vont se multiplier préférentiellement. Pour contrer cela, il faudra standardiser des contrôles qualité des produits obtenus, ainsi que des mesures préventives et correctives visant à minimiser au maximum l'apparition de ces instabilités qui vont se multiplier préférentiellement.

4) Comparaison de l'expression génique

Ensuite, pouvons-nous pour autant affirmer que ces deux types de cellules, ES et iPS, sont identiques ? De nombreuses études ont tenté de répondre à cette question ces dernières années. Les premières comparèrent trois lignées hESC et cinq lignées iPSC et remarquèrent, malgré l'apparente ressemblance entre ES et iPS, une centaine de gènes exprimés différemment (Chin et al, 2009). Puis

Tableau VII : nombre de clones ESC et iPS analysés dans les publications (Yamanaka, 2012)

Conclusion about the Relationship between ESCs and iPSCs	First Author	Year	Clone Numbers	
			ESC	iPSC
It is difficult to distinguish between them	A.M. Newman	2010	23	68
	M.G. Guenther	2010	36	54
	C. Bock	2011	20	12
There are notable differences	M. Chin	2009	3	5
	C.M. Marchetto	2009	2	2
	J. Deng	2009	3	4
	Z. Ghosh	2010	6	4
	A. Doi	2011	3	9
	Y. Ohi	2011	3	9
	K. Kim	2011	6	12
R. Lister	2011	2	5	

l'équipe de Deng signala des différences de méthylation de l'ADN après avoir séquencé quelques lignées hESC et iPSC (Deng et al, 2009). D'autres études suivirent, confirmant ces

différences de méthylation, traces d'une mémoire épigénétique (voir plus loin). Cependant, d'autres études ne trouvèrent pas de différences notables entre les deux types de cellules pluripotentes, sauf celles potentiellement attribuables aux différences de protocole (conditions de culture, méthode d'induction...) utilisées par chaque laboratoire. Bock et al (2011) démontrèrent même que certains clones iPSC sont indistinguables des ESC.

En répertoriant toutes les études de comparaison faites, on remarque que les études ayant noté une différence au niveau de la méthylation de l'ADN ou de l'expression des gènes n'ont comparé qu'un nombre très faible de cellules (moins de 10 cellules dans chaque groupe) tandis que celles qui concluent à la similarité entre hESC et iPSC ont analysés un plus grand nombre de clones, et des clones de laboratoires indépendants (Yamanaka, 2012) (tableau VII). De plus, les mutations génétiques qui ont pu être trouvées dans les iPSC semblent avoir pré-existées dans les cellules somatiques d'origine, et donc sont indépendantes de la reprogrammation elle-même (Young et al, 2012). Tout comme il est normal d'avoir quelques petites variations génétiques entre les clones iPSC par rapport à leurs cellules parentales, sans que cela affecte les fonctions des iPSC. Concernant la rentabilité en terme de quantité de cellules pluripotentes obtenues, les études là aussi ne sont pas d'accord. Certaines montrent

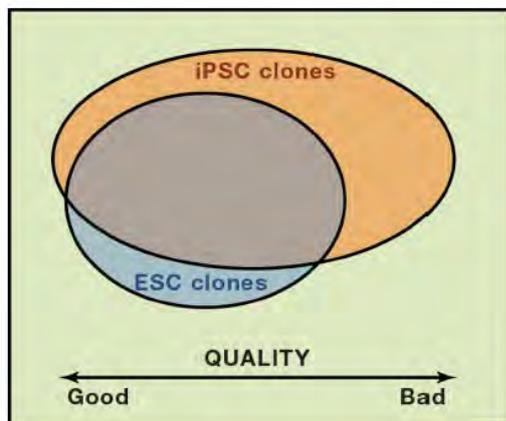


Figure 26 : Chevauchement des variations existantes entre ESC et iPSC (Yamanaka, 2012) Mesure de l'éventail de propriétés des ESC et iPSC, comprenant l'expression génique, la méthylation de l'ADN, la propension à se différencier, et (pour les souris) l'activité de complémentation. Après analyse des multiples études comparant les deux types, il apparaît que les propriétés des ESC et des iPSC se chevauchent en grande partie et sont difficiles à distinguer les unes des autres.

une meilleure efficacité avec les ESC, d'autres ne montrent aucune différence (Yamanaka, 2012). En conclusion, bien qu'il existe quelques variations entre ESC et iPSC, la ressemblance est frappante (figure 26). Aucun autre exemple d'un tel degré de ressemblance entre une cellule existant dans la nature et une cellule synthétique (car fabriquée par l'homme) n'avait été jamais observé. Comment l'expliquer ? Peut-être qu'en réalité, on ne pourrait pas qualifier les ESC de cellules naturelles, et que celles-ci n'existeraient pas vraiment dans les conditions physiologiques. Pour ne donner que quelques exemples, le gène ERas est fortement exprimé dans les ESC murins, mais pas dans les embryons ; les ESC présentent un ADN comportant un ensemble de méthylation tandis que les cellules de l'ICM le sont faiblement ; les ESC ont des

télomères plus longs que ceux observés dans les cellules de l'embryon... (Yamanaka, 2012)
On serait donc en train de comparer deux types de cellules, toutes deux synthétiques. Ceci amène à une autre question : ces deux cellules étant artificielles, les ESC représenteraient-elles vraiment le dernier contrôle, le « gold-standard » pour les iPSC ? Le Pr. Yamanaka ne pense pas ; pour lui au contraire, les iPSC n'ont pas besoin de se référer aux ESC pour se développer.

5) Comparaison de l'expression épigénétique

La différenciation des cellules pluripotentes vers telle ou telle lignée dépend des facteurs que l'on mettra en contact avec ces cellules. Je n'en ai pas parlé ici car il existe une multiplicité de méthodes et un nombre de facteurs de différenciation aussi grand que le nombre de cellules différenciées existantes. Toutefois un problème existant chez les iPSC et non chez les ESC doit être abordé : la « mémoire épigénétique ». Qu'est-ce que l'épigénétique ? C'est ce qui permet de contrôler l'expression de certains gènes, et de décider, tel un interrupteur, de leur activation ou de leur mise sous silence pour répondre aux besoins de l'organisme. Les facteurs épigénétiques modulant l'expression de ces gènes ne sont pas uniquement les régulateurs de la méthylation de l'ADN, mais aussi les modifications des histones et les remaniements ATP-dépendants de la chromatine (Yamanka et Blau, 2010). Un gène sous silence est méthylé et sa chromatine est condensée (hétérochromatine). Pour l'activer, il sera alors déméthylé, les histones seront sous forme relâchées (euchromatine), ce qui permettra aux facteurs de transcription d'atteindre ce gène et de synthétiser les protéines codées par ce gène. Une anomalie épigénétique n'est donc pas due aux erreurs présentes dans la séquence d'ADN (anomalie génétique), mais elle est due aux effets hérités de l'expression ou non des gènes. Les conséquences n'en sont pas moins grandes. Yamanaka et Blau prennent l'exemple d'une ruche. Toutes les abeilles, la reine comme les ouvrières, ont le même ADN. Pourtant, elles sont différentes, et ceci grâce à la gelée royale. Celle-ci a pour effet de diminuer le taux d'un unique régulateur épigénétique suppresseur, l'ADN-méthyltransférase DNMT3. La gelée royale est donc l'élément qui provoque les variations épigénétiques qui va orienter l'abeille vers l'expression génique d'une ouvrière, ou celle d'une reine, pour un même ADN à l'origine.

Le problème rencontré avec les cellules iPS fut que malgré leur reprogrammation, elles conservent une mémoire épigénétique du tissu donneur dont elles sont issues, c'est-à-

dire qu'elles se différencient préférentiellement vers leur tissu d'origine. Ceci s'explique parce que le phénomène de déméthylation de l'ADN se produit tardivement lors de la reprogrammation, et comme c'est un processus lent et plutôt inefficace, il reste une signature de méthylations résiduelles caractéristique du tissu d'origine (Brault, 2013). Ce sont ces hyper- et hypo-méthylations résiduelles qui s'opposent à l'activation de certains gènes d'autres lignages. Mais le recul de ces dernières années ont permis aux scientifiques de trouver des solutions afin d'effacer cette mémoire. Par exemple, la 5-azacytidine mime la déméthylation subie par le génome pendant les toutes premières divisions de l'embryon après transfert nucléaire, ce qui augmente l'efficacité de différenciation des iPSC (K.Kim et al, 2010). De façon plus sûre encore, des différenciations et reprogrammations successives remettent progressivement à zéro les cellules, leur mémoire s'effaçant à chaque mise en culture successives (figure 27).

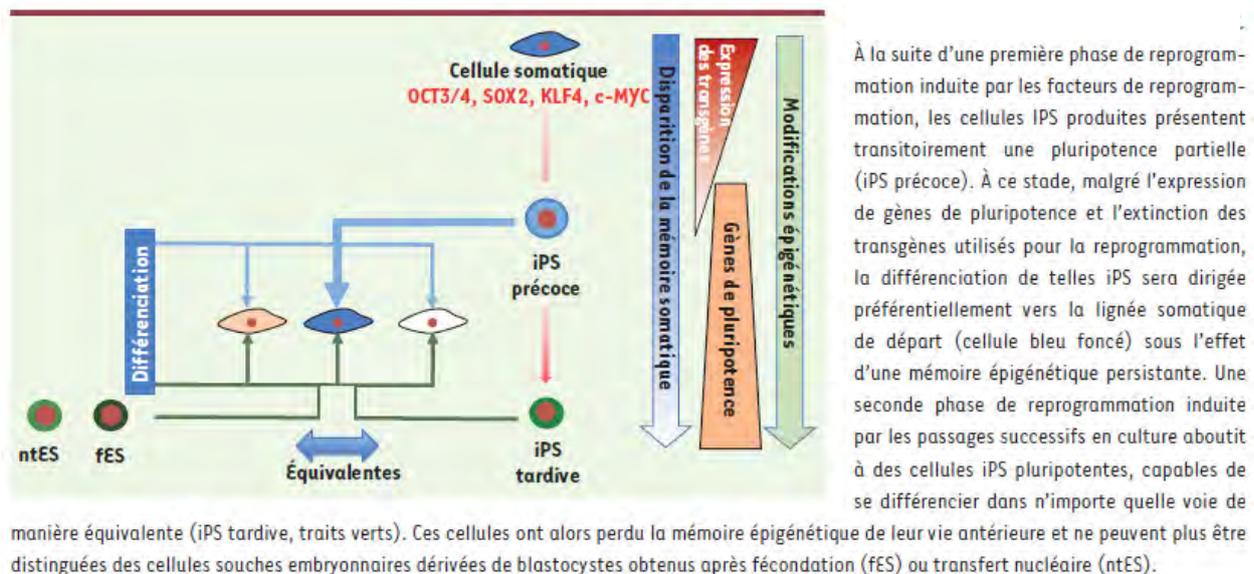


Figure 27 : Mémoire épigénétique de cellules iPS (Brault, 2013)

Ainsi donc, même si la mémoire épigénétique des cellules iPS fut un problème, cela ne l'est plus aujourd'hui, et les cellules iPS peuvent prétendre au même titre que les cellules ES à se différencier en n'importe quel type de cellules, sans risque d'interférence épigénétique ni de retour en arrière.

6) Screening et modélisation

Les deux types de cellules souches, ESC comme iPSC, se prêtent très bien au screening des molécules puisqu'elles permettent toutes deux d'obtenir de très grandes quantités de cellules. De plus, elles permettent toutes deux d'obtenir des modèles affectés par telle ou telle pathologie que l'on veut étudier. Mais là encore, les populations obtenues peuvent être assez hétérogènes. Cela nécessite un tri, et le rendement final peut en être amoindri. Dans ce domaine, les cellules iPSC possèdent *a priori* deux avantages sur les cellules ES. Tout d'abord, les iPSC permettent de produire des modèles cellulaires individualisés. Ces modèles permettront de représenter la diversité génétique de la population humaine *in vitro* au cours des essais précliniques. Et au cours des essais cliniques, une médecine personnalisée permettrait de mieux sélectionner les patients à inclure et de définir les biomarqueurs corrélés à leur réponse au traitement (Bionest Partner, 2010). Toutefois, une telle médecine personnalisée nécessiterait des moyens financiers et techniques énormes, puisque cela supposerait créer des lignées d'iPSC différentes pour chaque patient, ce qui est inenvisageable. Les scientifiques souhaitent plutôt la formation d'une banque de cellules dont le typage HLA serait défini pour éviter tout rejet immunologique. Hervé Chneiweiss, président du comité d'éthique de l'Inserm, estime que 60 000 variants permettraient de couvrir toute la diversité génétique française. Dans ces cas là, de telles banques peuvent être montées à partir de cellules ES comme de cellules iPSC. Nous avons d'ailleurs déjà vu les toutes premières banques en cours de développement en Europe et aux Etats-Unis (Tableau V, 2^{ème} chapitre A-1b). En attendant la formation complète de ces banques, les protocoles de différenciation standardisés sont encore à améliorer, surtout si l'on veut industrialiser les procédés afin d'exploiter à grande échelle les cocktails de molécules sur les cellules.

Le deuxième avantage des cellules iPSC sur les ES est qu'elles permettent de modéliser toutes les maladies, sans se restreindre à celles dépistables par DPI. En effet, les modèles pathologiques disponibles à partir d'ESC humaines proviennent des embryons dont la pathologie a été détectée lors du diagnostic pré-implantatoire au cours d'une FIV. Le DPI est le plus souvent utilisé pour détecter des mutations liées à des maladies héréditaires monogéniques rares, voire mortelles, suite à l'observation d'antécédents familiaux, comme par exemple : la mucoviscidose, la dystrophie musculaire de Duchenne, la myotonie de Steinert, la maladie de Huntington, l'amyotrophie spinale infantile et l'hémophilie. Mais pour les maladies multi-factorielles, on estime que la composante génétique ne suffit pas à fournir

un pronostic fiable car leur développement est soumis aussi à des influences environnementales. Il s'agit par exemple de nombreux cancers ou de maladies cardiovasculaires, métaboliques (diabète) et neurodégénératives (maladie d'Alzheimer). Pour toutes ces maladies, il est facile d'obtenir des modèles pathologiques à partir de cellules iPS puisqu'il suffit d'une biopsie de peau d'un patient atteint. En conclusion, les premières banques de cellules souches pluripotentes se développant aujourd'hui répertorient à la fois des cellules ES et des cellules iPS, pour pouvoir dupliquer les expériences sur les deux types de cellules. Pour les scientifiques, il semble que ces deux types de cellules soient complémentaires plutôt que concurrentes.

7) Comparaison des coûts

Il est difficile d'estimer le coût des techniques permettant d'obtenir des cellules souches pluripotentes. De plus, celui-ci varie en fonction des protocoles utilisés, qui diffèrent entre chaque laboratoire. Mais globalement, l'obtention de cellules iPS coûte plus cher que l'obtention de cellules ES. D'autant plus qu'obtenir des embryons humains est gratuit, si l'on considère que si ceux-ci ne sont pas utilisés pour la recherche, ils seront jetés.

Pour anecdote, la société de biotechnologie Collectis a lancé en septembre 2013 un nouveau service par sa filiale Scéil : pour 60 000 dollars (47 000 euros), celui de reprogrammer et de stocker les cellules du client à partir d'un petit morceau de sa peau, assorti d'un forfait de maintenance à partir de la troisième année de stockage à 500 dollars par an. L'objectif étant, quand le client -ou patient- en aura besoin et lorsque les progrès de la médecine le permettront, de puiser dans son propre stock de cellules pour régénérer une partie de ses organes.

8) Comparaison des réponses immunologiques

Lorsque furent découvertes les cellules iPS par Yamanaka en 2006, on mit en avant le principal avantage par rapport aux cellules ES : celui de pouvoir être produites à partir du patient lui-même, et donc de ne pas occasionner de rejet immunitaire. Leur immunogénicité ne fut pas vraiment étudié tant il semblait couler de source que les cellules reprogrammées

portaient les mêmes marqueurs d'immunogénicité que ceux qu'elles avaient à leur état d'origine.

Ce fut Zhao et al. qui se penchèrent sérieusement les premiers sur la question, en étudiant les réactions immunologiques de 3 modèles : une autogreffe de cellules iPS, une autogreffe d'ESC et une allogreffe d'ESC (Zhao et al, 2011). Ils signalèrent ainsi une réponse immune inattendue aux tératomes formés à partir de cellules iPS murines syngéniques (génétiquement identiques), une expression anormale de protéines et une infiltration de lymphocytes T alloréactifs. Il était pourtant admis depuis toujours qu'une auto-greffe, même de cellules iPS, ne provoque aucun rejet de l'hôte grâce à l'auto-tolérance. Les médias réagirent de façon excessive à ces résultats, jusqu'à douter d'une utilisation possible des cellules iPS en médecine régénératrice.

Depuis, deux autres études contrebalancèrent ces premières observations. Tout d'abord, l'équipe de Guha testa l'immunogénicité de cellules endothéliales, hépatocytaires et neuronales dérivées de cellules ES et iPS, en évaluant la réponse des lymphocytes T cytotoxiques *in vitro et in vivo* (Guha et al, 2013). Les expériences en culture tout comme celles sur les tissus transplantés dans des souris syngéniques mirent en évidence une absence de lymphocytes T cytotoxiques et aucune réponse immunitaire aux cellules iPS syngéniques, résultats confirmés par l'histologie et l'immuno-histochimie du tissu transplanté. L'équipe d'Araki, elle, appuya ses travaux sur des greffons de peau et de la moelle osseuse issue de souris chimériques iPS ou ES, et compara l'immunogénicité des cellules iPS à celle des cellules ES (Araki et al, 2013). Elle arriva aux mêmes conclusions que Guha et al., à savoir qu'ils ne constatèrent aucun rejet immunologique des cellules greffées.

Comment expliquer alors les résultats de Zhao et al ? Okita et Yamanaka (2011) proposent une explication. Lorsque des cellules transformées apparaissent dans le corps, le système immunitaire les détecte et tente de les éliminer. Sachant que Zhao et al. avaient utilisé des cellules iPS indifférenciées, il n'est par conséquent pas étonnant d'observer une infiltration de lymphocytes T cytotoxiques dans les tératomes formés à partir de ces cellules iPS. La réaction immunitaire observée est la réaction habituelle contre des cellules indifférenciées. Les cellules iPS utilisées par Zhao et al. se sont probablement différenciées plus lentement que les cellules ES contrôles.

Une seconde observation a été faite, qui est que le choix du vecteur de reprogrammation affecterait l'immunogénicité. Les vecteurs rétroviraux, méthode choisie par l'équipe de Zhao, causent occasionnellement des pertes de transgènes ou l'activation des gènes voisins des sites d'intégration, menant à la production aberrante de protéines immunogéniques, tel Oct4 (Dhodapkar et al, 2010). L'équipe d'Araki utilisa uniquement des plasmides, et celle de Guha des plasmides et des lentivirus pour synthétiser leurs cellules iPS. Il faut donc retenir que lors des applications thérapeutiques de ces cellules iPS, il ne faudra pas utiliser la méthode avec des rétrovirus, afin d'éviter, en plus de la toxicité génique occasionnée par la présence d'un vecteur, le risque de rejet immunologique (Kaneko et Yamanaka, 2013).

En conclusion, les cellules iPS gardent l'avantage sur les cellules ES, puisque les cellules ES occasionnent à coup sûr un rejet immunologique, contrairement des cellules iPS, lorsqu'elles sont synthétisées avec le bon protocole. C'est un énorme avantage, lorsque l'on sait les complications que peuvent entraîner un traitement à vie par immunosuppresseurs : infections virales, bactériennes et fongiques, insuffisance rénale, cancer, toxicité neurologique, complications métaboliques (diabète), hypertension, ostéoporose... Enorme avantage de ces cellules iPS, donc, mais même avec ces résultats très positifs, il faudra continuer à rester prudent et à contrôler chaque type de cellules iPS que l'on voudra utiliser en clinique.

9) Réglementation

L'autre différence majeure résidant entre les cellules ES et les cellules iPS, outre le statut immunologique, se trouve dans les lois encadrant ces cellules. En effet, pour obtenir des cellules iPS, il suffit d'une simple biopsie de peau d'un donneur. Le prélèvement de cellules ou de tissus sur donneur vivant, encadré par la loi de bioéthique L.1241-1 à L.1241-7 CSP, nécessite l'information du donneur sur le prélèvement et ses risques, ainsi que son consentement libre et éclairé. Ce consentement est donné puis peut être confirmé après un délai de réflexion de 3 mois ; il est révocable sans motif tant que les recherches n'ont pas débuté.

Cela est bien plus compliqué pour obtenir des embryons humains, puisque toute production de cellules ES humaines nécessite obligatoirement leur destruction. Personne ne

sachant exactement quel est le statut de l'embryon, sujet ou objet, la réglementation reste très prudente sur son utilisation. Mais nous verrons que cela occasionne certaines contradictions. En France, la recherche ne peut utiliser que des embryons conçus *in vitro* dans le cadre d'une AMP (aide médicale à la procréation), après recueil du consentement libre et éclairé du couple à l'origine de la conception des embryons à deux reprises à trois mois d'intervalle. Cette décision est révoquée sans motif tant que les recherches n'ont pas débuté. Ces embryons peuvent être :

- des embryons surnuméraires sains, congelés et ne faisant plus l'objet d'un projet parental,
- des embryons dont la qualité n'était pas suffisante pour mener à terme la FIV pour laquelle ils ont été conçus
- des embryons conçus dans l'optique d'une FIV mais dont le DPI les a considérés comme porteurs d'une maladie génétique.

Les embryons sur lesquels une recherche a été conduite ne peuvent évidemment pas être transférés par la suite à des fins de gestation.

De plus, selon la loi L2151-2 CSP, « la conception *in vitro* d'embryon ou la constitution par clonage d'embryon humain à des fins de recherche est interdite ». Pourtant, on notera que la loi de bioéthique a quand même prévu la possibilité d'importer des lignées obtenues à l'étranger après autorisation de l'ABM (agence de la biomédecine). Les ressources en embryons sont donc largement suffisantes et accessibles pour couvrir les besoins de la recherche.

La restriction se trouve plutôt du côté de la finalité de l'utilisation de ces embryons. Il faut alors se pencher sur les quatre lois de bioéthique : celles du 29 juillet 1994 (lois n°94-548, 94-653 et 94-654), d'abord, puis celle du 6 août 2004 (loi n°2004-800) et sa révision le 7 juillet 2011 (loi n°2011-814) et enfin celle du 6 août 2013 (loi n°2013-715).

La première loi de bioéthique définissait les conditions de réalisation des FIV et autorisait la création et la congélation d'embryons. Par contre, elle édictait une interdiction absolue de toute expérimentation sur l'embryon et les cellules ES, seules les études ne portant pas atteinte à l'embryon étant autorisées à titre exceptionnel.

Les deux lois suivantes, de 2004 et de 2011, tentaient de trouver un compromis entre les parlementaires hostiles à la recherche sur l'embryon au nom de la dignité humaine, et ceux qui en étaient partisans au nom de la liberté de la recherche : elle prévoyait un régime d'interdiction des recherches sur l'embryon et les cellules ES, accompagné de modalités d'autorisation à titre dérogatoire. Par dérogation, l'article L2151-5 CSP autorisait pour une période de 5 ans la recherche sur l'embryon et les cellules ES, à condition que cette recherche :

- soit de pertinence scientifique bien établie et qu'elle puisse permettre des progrès médicaux majeurs,
- s'inscrive dans une finalité médicale,
- « il est expressément établi qu'il est impossible de parvenir au résultat escompté par le biais d'une recherche ne recourant pas à des embryons humains, des cellules ES ou des lignées de cellules souches ; »
- le projet et les conditions de mise en œuvre du protocole doivent respecter les principes éthiques de la recherche sur l'embryon et les cellules ES.

Mais la dernière loi de bioéthique, celle du 6 août 2013, a substitué la dérogation par un régime d'autorisation encadré. L'autorisation ou le rejet des projets de recherche sont confiés à l'ABM, mais il est donné la possibilité aux ministres de la recherche et de la santé de demander un réexamen s'ils le souhaitent. Enfin, l'autorisation de recherche n'est donnée que si l'embryon n'est ni conçu, ni constitué par clonage, ni utilisé, à des fins commerciales ou industrielles (Art. L2151-3). La France a longtemps observé une grande réticence à utiliser les embryons comme simple produit de recherche, réticence qui peu à peu s'estompe, non grâce à l'évolution des techniques qui resteraient dans le domaine de l'éthique, mais à l'inverse, par une évolution de l'éthique qui s'adapte aux besoins des techniques. Je cite un rapport d'information émis par le Sénat : *« la poursuite et l'accélération des progrès scientifiques dans le domaine de l'embryologie fourniront au législateur de nouvelles questions à trancher lors de la discussion de la prochaine révision de la loi de bioéthique. »* Il est étonnant de constater que la bioéthique, loin de tenir son rôle normatif en énonçant certaines règles et barrières à ne pas franchir, se plie aux exigences de la technique et de ses besoins toujours grandissants.

Depuis la possibilité de dérogation à la loi de bioéthique, entre août 2004 et septembre 2012, 190 autorisations et 35 renouvellements d'autorisation ont été données par l'ABM, soit :

- pour les protocoles de recherche : 76 autorisations et 24 renouvellements,
- pour la conservation d'ESC : 28 autorisations et 11 renouvellements,
- 49 autorisations pour l'importation de lignées de cellules ES

De plus, 12 demandes ont été refusées et 13 protocoles de recherche ont été retirés. La lourdeur des démarches administratives concernant l'utilisation de cellules ES à des fins de recherche a fait prendre du retard à la France dans ce domaine. Dix ans d'après le Dr. Jacques Hatzfeld du CNRS, mais ce retard est à nuancer d'après le Pr. Axel Kahn de l'Inserm lorsqu'on le compare d'un côté aux recherches entreprises dans le même temps sur les autres types de cellules souches, et de l'autre côté aux recherches des autres pays. Concernant les législations en vigueur dans les autres pays, on peut les classer en quatre catégories (L.Reppel, 2011) :

- *Législation permissive* : l'utilisation de la majorité des techniques est permise concernant la recherche sur l'embryon, à l'exception du clonage reproductif. Ex : Royaume-Uni, Belgique, Espagne, Etats-Unis, Singapour.
- *Législation permissive avec restriction* (cas de la France) : les recherches sur l'embryon et les lignées de cellules ES humaines sont permises (ou non interdites), ainsi que la dérivation de nouvelles lignées à partir d'embryons surnuméraires. Par contre, la technique de clonage thérapeutique et la création d'embryons pour la recherche sont interdites. Ex : Canada, Pays-Bas, Brésil.
- *Législation restrictive* : les recherches sur l'embryon (donc dérivation de lignées de ESC) sont interdites, mais pas les recherches utilisant des lignées importées de l'étranger. Ex : Allemagne, Italie.
- *Législation d'interdiction* : l'ensemble des recherches est interdit : recherches sur l'embryon, dérivation de lignées d'ESC, recherche sur les cellules ES humaines, même importées. Ex : Pologne, Irlande, Russie.

La France est donc dans un retard tout relatif. De plus, on ne peut attribuer ce « retard » dans les recherches uniquement aux contraintes législatives. En effet, le manque de

moyens humain est devenu crucial en France : 51% des chercheurs français ont plus de cinquante ans, et la part des chercheurs dans la population active est seulement de 6 pour mille en Europe contre 8 pour mille aux Etats-Unis et 10 pour mille au Japon. S'ajoutent à cela les difficultés financières et la lourdeur des démarches administratives.

Pour revenir à la comparaison des législations en France entre les cellules hES et hiPS, on comprend aisément que la préférence est donnée aux cellules iPS de part leur absence de limitations éthiques, ce qui allège considérablement les démarches administratives nécessaires à l'obtention de ces cellules.

10) Conclusion

Pour conclure cette comparaison entre cellule ES et cellule iPS, on peut s'aider de ce tableau qui résume les avantages et les inconvénients à utiliser l'une ou l'autre (tableau VIII).

Tableau VIII : Comparaison entre cellules ES et cellules iPS.

	hESC	hiPSC
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> • Potentiel développemental illimité (pluripotence) <ul style="list-style-type: none"> • Expansion illimitée (autorenouvellement) • Cribles pharmacologiques et génétiques <ul style="list-style-type: none"> • Modélisation 	<ul style="list-style-type: none"> • Source illimitée et identifiée • Potentiel développemental illimité (pluripotence) <ul style="list-style-type: none"> • Expansion illimitée (autorenouvellement) • Cribles pharmacologiques et génétiques <ul style="list-style-type: none"> • Modélisation • Immunohistocompatibilité • Pas de limitation éthique
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> • Modèle développemental difficilement comparable à l'<i>in vivo</i> <ul style="list-style-type: none"> • Variabilité interlignée • Limitations éthique 	<ul style="list-style-type: none"> • Modèle développemental difficilement comparable à l'<i>in vivo</i> • Procédés encore non standardisés pour les cellules humaines <ul style="list-style-type: none"> • Coût

Force est de constater que les cellules iPS sont devenues en quelques années (à peine 8 ans) incontournables dans le domaine des cellules souches, grâce en grande partie à leur absence d'immunogénicité et de problème éthique, détrônant ainsi la primauté des cellules ES. Tout chercheur travaillant sur les cellules ES humaines ne pourra bientôt se passer de

dupliquer ses travaux en utilisant des cellules hiPS afin de comparer l'efficacité des deux méthodes. Mais dupliquer ainsi les protocoles n'engendrerait-il pas un surcoût ? Est-ce bien nécessaire ?

Loin de ces considérations financières, immunologiques, thérapeutiques et techniques, nous allons maintenant nous pencher sur quelques réflexions bioéthiques en rapport à ces cellules. Car toutes ces techniques n'ont en vérité qu'un seul but : celui de servir à l'homme. On peut se demander où est la place de l'homme dans cette course à la recherche. C'est ce que nous allons voir dans le troisième chapitre.

Troisième Chapitre : Réflexions bioéthiques

Autoriser ou non la recherche sur les cellules souches embryonnaires humaines est une question éthique très délicate, qui a occasionné et occasionne encore de vives réactions de la part des scientifiques comme de la part des politiques et de toute personne s'intéressant à cette question de société. Partout, la question demeure : l'embryon est-il une chose ou une personne ? Tout le monde a un avis, personne n'a de preuve de ce qui est avancé, et les deux partis en viennent à se traiter de tous les noms. Sur internet, le débat fait rage : certains dénoncent une science « utilitariste et sans valeur », reprochant aux scientifiques de céder à l'appât du gain et de la gloire, d'autres accusent les réfractaires « d'imposer une vision ultra-conservatrice et réactionnaire », reprochant notamment à l'Eglise catholique d'édicter des dogmes arbitraires ; nombreux sont ceux qui ne savent même pas exactement ce qu'est un embryon, l'amalgamant aux gamètes.

Les uns ont peur du changement, les autres ont peur qu'on ne porte atteinte à la liberté, ou qu'on ne touche à la vie, d'autres enfin craignent qu'on entrave le progrès... Toutes ces raisons sont légitimes, mais la peur n'a jamais été vectrice d'évolution, alors obligeons-nous à faire face, et quelque soit notre avis, apprenons à écouter, à nous enrichir des divers avis, et à construire notre opinion sur des bases concrètes, fondées sur le réel.

A. Problèmes éthiques posés par les cellules ES humaines

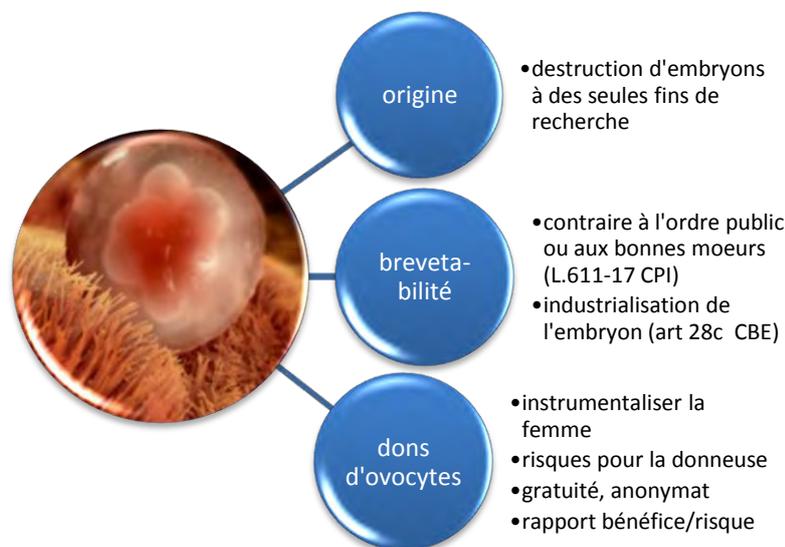


Figure 28 : les trois problèmes éthiques soulevés par les cellules embryonnaires humaines.

Les cellules ES humaines posent principalement trois problèmes éthiques (figure 28) : celui de leur origine puisque leur obtention suppose la destruction d'un embryon, celui de la brevetabilité des inventions à partir de cellules ES, et celui du don d'ovocytes lorsque la femme demandant la FIV est stérile. Les problèmes éthiques du don d'ovocytes ne seront pas abordés ici car c'est une autre vaste question.

1) La nature de la cellule embryonnaire

L'embryon ne peut être pris comme un simple appendice du corps de la femme. En effet : un embryon possède son propre patrimoine génétique, différent de celui de son père, différent de celui de sa mère, et même différent de tout individu ayant existé jusqu'alors. Il suffit de comparer les groupes sanguins ou encore les systèmes HLA de l'embryon et de la mère pour le constater, comme en témoignent les cas d'incompatibilité sanguine fœto-maternelles. Mais si l'embryon n'est pas une partie de la mère, qu'est-ce donc ?

a) La cellule embryonnaire ne peut être amalgamée aux gamètes

Certains scientifiques ont émis l'hypothèse que, puisque l'on peut transformer une cellule du corps en un embryon par la technique de la reprogrammation, il n'y aurait par conséquent pas de différence éthiquement parlant entre une cellule quelle qu'elle soit reprogrammée au stade totipotent et la cellule œuf (Magill et Neaves, 2009). Si l'on pousse le raisonnement plus loin, on peut alors amalgamer l'éthique d'un simple gamète (spermatozoïde ou ovocyte) à celui du zygote, puisqu'ils ont la même capacité : former un individu unique. Il est vrai qu'une cellule somatique pourra, après reprogrammation et culture dans les conditions appropriées, donner un organisme entier. De même, un gamète peut donner un individu vivant après fusion avec un autre gamète. Mais c'est une grande erreur que d'appliquer un même statut éthique à tout cela. La grande différence se trouve dans la potentialité de la cellule : une cellule œuf possède une potentialité à former un organisme en elle-même. Cette propriété lui est intrinsèque, son matériel génétique n'appelle aucun changement puisqu'il contient déjà toute l'information nécessaire à son développement. Au contraire, la cellule somatique devra subir quelques changements génétiques pour pouvoir être reprogrammée, et c'est bien dans cette intervention technique que réside la différence essentielle entre une cellule somatique et une cellule œuf. De la même façon, un ovocyte ne pourra se développer en embryon qu'après la fusion fondamentale avec le génome d'un

spermatozoïde. L'information élémentaire donnant aux cellules une organisation bien spécifique est entièrement contenue dans la cellule œuf alors qu'elle est incomplète dans une cellule somatique ou un gamète. Par conséquent, on ne peut raisonnablement pas mêler l'éthique concernant un zygote à celle concernant une autre cellule.

b) La cellule embryonnaire n'est pas un embryon

D'autres scientifiques ont insisté sur le fait que l'embryon ne peut être réduit aux cellules ES. En faisant cette distinction entre l'embryon et les cellules ES, cela exempte la recherche utilisant des cellules ES du poids éthique de l'embryon. Cette idée fut appuyée par le tribunal administratif de Paris le 21 janvier 2003. Une autorisation d'importer des lignées de cellules ES avait été attaquée sur le motif qu'elle dérogeait au principe d'interdiction des recherches sur les embryons de la loi de 1994. Le jugement du tribunal fut que « *les cellules souches ne peuvent être regardées comme des embryons* ». Ce qui fut confirmé par l'arrêt du 9 mai 2005 de la Cour administrative d'appel de Paris : « *les cellules souches totipotentes prélevées sur des embryons humains au stade de blastocyste ne constituent pas l'embryon et sont insusceptibles de permettre le développement d'un embryon* ». Une telle position permet de considérer les cellules ES, tout comme les cellules iPS, comme n'importe quel autre élément du corps humain (Poisson et Gosselin, 2013). Commençons par nous demander si une cellule ES est vraiment distincte d'un embryon entier.

Nous observons en effet que les cellules ES, en dehors de leur contexte naturel, ne produisent pas de fœtus mais des tumeurs contenant de nombreux types de cellules différentes. L'importante différence réside dans le fait que ces tumeurs ne possèdent aucune organisation cohérente nécessaire à tout organisme. Certes, les cellules ES peuvent agir comme une partie de l'embryon, mais toujours en réponse à un environnement embryonnaire existant, et jamais comme l'ensemble d'un organisme. Elles ne produisent pas d'elles-mêmes les tissus matures puisqu'elles ont besoin de la collaboration des autres cellules de l'embryon (Couderc, 2014). Par conséquent, il est effectivement juste de distinguer l'embryon, organisme à part entière, de ses cellules ES, qui ne peuvent former un individu qu'en recevant les informations nécessaires de la part des cellules environnantes.

Pouvons-nous en conclure que l'utilisation des cellules embryonnaires ne pose pas de problème éthique ? Rien n'est moins sûr. Même si ces cellules ne sont pas des individus en

eux-mêmes, leur obtention nécessite la destruction de l'embryon. Certaines techniques ont tenté de prélever des cellules ES sans porter atteinte à l'embryon lui-même, mais avec une faible efficacité. Mais même si cette technique était au point, serait-il éthique d'implanter en vue d'une grossesse un embryon sur lequel des manipulations génétiques ont déjà été faites ? Pas vraiment ; l'obtention de cellules ES implique nécessairement la destruction de l'embryon dont il provient, et l'oublier serait contraire à l'honnêteté morale. Ainsi, ces cellules posent un problème éthique, non par ce qu'elles sont, mais par leur origine et la technique de leur obtention, ce qui nous renvoie à la question de la nature de l'embryon.

2) Lever l'hypocrisie sur une pratique déjà répandue :
l'incohérence de la loi

La loi ouvrit en 2004 la voie à la recherche sur les cellules ES humaines pour des motifs thérapeutiques, tout en conservant le principe de leur interdiction, mais celle-ci n'avait déjà plus qu'une valeur symbolique. En effet, la loi prônait un interdit tout en organisant les conditions de sa transgression : la recherche sur les cellules ES était déjà largement répandue de part les nombreuses dérogations accordées aux scientifiques. La loi de 2013 voulut donc clarifier la situation et surtout faciliter l'accès à ce type de cellules : on passa d'un régime d'interdiction avec dérogation à un régime d'autorisation encadrée par des conditions. Un des arguments des partisans de ce changement fut que la loi n'était pas représentative de l'utilisation réelle de la technique, interdite en théorie seulement. Il fallait donc « lever l'hypocrisie » et être honnête envers soi-même : la pratique est déjà répandue, autant l'autoriser pour mieux l'encadrer. Mais cet argument n'est pas recevable. En effet, bien que la loi s'adapte à l'évolution de la société, elle n'est pas là pour légaliser toutes les pratiques sous prétexte qu'elles sont monnaie courante. La corruption peut être fortement pratiquée dans certains pays, mais personne ne songe à la légaliser. D'autres exemples existent en France, comme la légalisation du racolage ou encore la légalisation du cannabis, qui n'ont pas été acceptés sous prétexte que la pratique se fait déjà.

Mais le principal argument invoqué fut celui de faciliter l'accès aux cellules embryonnaires humaines. En effet, la loi de 2013 permet de libéraliser la recherche sur l'embryon. Quant au message de fond du texte de loi, il change radicalement de vision puisque la règle fondatrice est la non-protection de l'embryon, et sa protection n'existe que grâce à certains critères définis par ladite loi.

Pourtant, ce changement de régime ne modifie en rien l'ambivalence de cette loi concernant la nature de l'embryon. La recherche sur l'embryon est autorisée si elle s'inscrit dans une finalité médicale et ne peut pas être menée autrement. De plus, les embryons utilisés ne peuvent provenir que d'un abandon de projet parental lors d'une FIV, et ne peuvent pas être fabriqués dans le but de servir à la recherche. Il y a bien là une incohérence de la loi : si l'embryon est une chose, on ne voit pas pourquoi on ne pourrait pas fabriquer des embryons à des fins de recherche, et les conditions encadrant l'autorisation de recherche sont superflues et entravent inutilement la recherche. Au contraire, si l'embryon est une personne, aucune recherche ne devrait être entreprise sur lui, quel qu'en soit le but. Il n'y a pourtant pas dix choix possibles : soit l'embryon est une personne, soit il ne l'est pas, et dans ce cas, c'est une chose. Il n'existe pas d'intermédiaire ni de troisième statut.

On peut observer clairement cette incohérence à travers la jurisprudence : la cour administrative d'appel de Douai a ainsi affirmé que les embryons décongelés par erreur ne sont ni des êtres humains ni des produits humains, « *aucun préjudice ne peut donc être reconnu par la perte d'embryons, qui, n'étant ni personne ni chose, n'est rien !* » (Mirkovic, 2010) La loi n'étant pas claire, certaines juridictions appliquent le droit des personnes, tandis que d'autres ne considèrent pas l'embryon comme une personne. Mais, rebuté à l'idée d'appliquer le droit des biens à l'embryon, ils finissent par le reléguer dans une zone de non-droit. Ce statut hybride, rédigé dans la loi par « personne humaine potentielle » n'est défini que par ce qu'il n'est pas : ni une chose, ni une personne humaine, mais une simple potentialité. Or, il n'existe pas en droit le statut de « potentialité », et il faut pourtant trancher à chaque fois que la question se présente. On constate que maintenir le flou sur la nature de l'embryon revient à laisser à chaque juridiction le choix arbitraire de le protéger ou non. Or la qualité de personne ne relève pas de l'opinion, comme nous le verrons plus loin

En conclusion, lors de la révision des lois de bioéthique en 2013 concernant la recherche sur l'embryon, nombreux sont les scientifiques qui préconisaient le passage à une autorisation encadrée afin d'être cohérent quant au statut de l'embryon, et cohérent avec ce qui était déjà pratiqué. On s'aperçoit pourtant après l'autorisation donnée, que l'incohérence est toujours là et il est fort probable que les pratiques iront toujours plus loin si la loi reste dans ce flou présent. Ce dernier point n'est pas de l'avis de tout le monde, aussi pouvons-nous nous demander si un cadre rigoureux pourrait éviter une dérive des pratiques.

3) Un encadrement rigoureux pour éviter tout abus

Dans un but d'encadrer les autorisations données sur la recherche à partir de cellules ES humaines, la loi de juillet 2013 liste quatre conditions d'autorisation, inspirées des conditions de dérogation des lois précédentes :

- le projet doit avoir une pertinence scientifique établie. La condition qu'elle mène à des progrès médicaux majeurs n'est plus demandée,
- la finalité du projet doit être médicale,
- la recherche ne peut être menée par une méthode alternative d'efficacité comparable en l'état des connaissances scientifiques. La mention « il est expressément établi » a été supprimée, ce qui modifie la charge de la preuve. Le « résultat escompté » a aussi été supprimé, le but final n'ayant plus à être détaillé ;
- le projet et le protocole doivent respecter les principes éthiques de la recherche sur l'embryon et les cellules ES.

Cet encadrement a pour but d'empêcher toute recherche qui ne répondrait pas à ces critères. Mais ces critères sont-ils aussi restrictifs qu'on le dit ?

La condition de mener à des progrès médicaux majeurs a été supprimée car elle n'avait que peu d'utilité en pratique : en effet, en matière de recherche on ne sait pas lorsque l'on commence ce que l'on va trouver ; difficile alors de prédire si le résultat permettra des « progrès majeurs ». De la même manière, il semble qu'il ne soit pas possible d'affirmer *a priori* qu'aucune méthode d'efficacité comparable n'existe avant même d'avoir testé l'une et l'autre méthode. Ensuite, il est demandé de « respecter les principes éthique », qui sont ceux énoncés plus haut (2^{ème} Chapitre, B-8 Réglementation). Si les démarches administratives sont bien suivies (utilisation des embryons surnuméraires, demande de consentements libres et éclairés etc...), elles n'ont pas lieu de refuser un projet de recherche de se faire. Il ne reste plus que la condition demandant que la finalité du projet soit médicale. Au vu de la variété des projets de recherche médicale existant, la contrainte est bien faible. La « pertinence scientifique » demandée n'est pas plus contraignante, étant donné l'imprécision de la formule. Ces observations nous mènent à nous demander quelles recherches voulant utiliser les cellules ES pourraient bien être refusées. Ces critères, plutôt que d'encadrer la recherche sur les

cellules ES, semblent ouvrir la porte à tous les projets qui naîtront de l'imagination des chercheurs, pour peu qu'ils présentent leur projet avec assez de conviction.

Le deuxième point qu'il faut souligner c'est que la science est une éternelle insatisfaite. Dans la majorité des cas, concernant les lois la réglementant, toute interdiction permettant des dérogations aboutira à une autorisation encadrée, et aucun cadre, aussi strict soit-il, ne garantit son total respect ni sa validité permanente. L'Histoire nous le prouve chaque jour : ce qui était autrefois illégal est aujourd'hui légal. Cela est bien sûr heureux, car cela signifie que les lois s'adaptent à la société dont les mentalités évoluent. Attention toutefois à ne pas changer les lois au gré des changements de l'opinion publique ou des envies des uns et des autres. La recherche a une soif de savoir infinie, mais ce n'est pas pour cela qu'il faut tout lui céder, au risque de perdre de vue ce pour quoi elle existe : servir l'homme, et non pas se servir de l'homme. Nous trouvons un exemple concret dans les paroles de Madame Geneviève Fiorasco, ministre de la recherche, lors de la révision de 2013 : « *Tel qu'il est formulé, cet alinéa est très restrictif pour les chercheurs, [...] Les recherches liées au screening à visée pharmaceutique ou à la modélisation des pathologies pourraient se heurter à cet alinéa. D'où la nouvelle rédaction que je suggère* ». Sitôt la recherche autorisée, on pense déjà à industrialiser le procédé, ce qui n'était pas envisageable il y a quelques années à peine. Ce changement n'est pas dû à un changement de nature de l'embryon, mais à des besoins plus vastes de la part de la recherche. Le problème initial demeure, et la question de la nature de l'embryon reste irrésolue.

Ainsi donc, l'encadrement qualifié de « rigoureux » ne l'est pas vraiment dans la loi de 2013. Quoi qu'il en soit, un encadrement aussi rigoureux soit-il n'évite pas les abus (il y aura toujours des transgresseurs, chez les scientifiques comme ailleurs) et ne garantit pas une loi conforme à l'éthique. Il semble donc que les conditions d'encadrement ne soient là que pour rassurer ; elles sont inopérantes à empêcher les dérives scientifiques et éthiques.

4) La France a un fort retard à rattraper

L'argument le plus souvent évoqué en parlant de cellules souches embryonnaires est d'accuser la législation française, bien trop restrictive, de freiner la recherche et de lui ôter toute opportunité d'être compétitive sur le plan international. Il est vrai que peu de recherches utilisant les cellules ES ont été faites en France en comparaison à certains pays comme les Etats-Unis, le Royaume-Uni, la Belgique et l'Espagne. Mais comme le souligne le CCNE, le retard de la France semble autant tenir du manque de moyens publics consacrés à la recherche qu'à des contraintes législatives. Il est vrai qu'en France, les financements publics réservés à la recherche sur tous les types de cellules souches sont faibles (22 M€ en 2005). La fuite des cerveaux vers le Royaume-Uni et les Etats-Unis est réelle et le gouvernement français aide peu à la création de sociétés. Il n'existe donc que très peu de sociétés travaillant dans ce domaine en France (environ 10), presque toutes à un stade précoce, et peu de produits en développement clinique (figure 29).

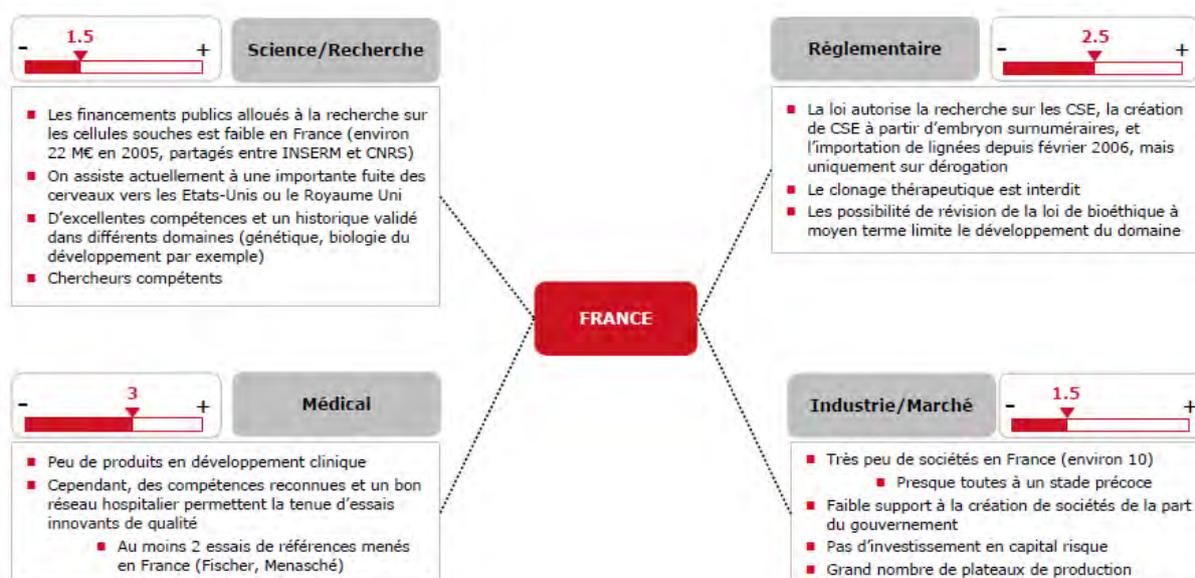


Figure 29 : Les différentes raisons du retard de la France dans le développement de la thérapie cellulaire. (Bionest Partner, 2007) . « La France a accumulé un important retard en recherche sur les cellules souches dû à une adoption tardive de lois plus permissives, mais aussi par l'absence d'investissement public de la part des agences publiques. Les compétences scientifiques sont reconnues mais on assiste à une importante fuite de cerveaux vers des pays plus compétitifs. Les sociétés de ce domaine sont encore à des stades précoces, et ne bénéficient pas du support des grandes sociétés pharmaceutiques »

Ce retard est incontestable, mais pas considérable quand on sait que ces cellules sont connues et utilisées à l'étranger depuis plus de trente ans pour les lignées murines, et bientôt dix-sept pour les lignées humaines. Leur essor est très lent malgré le fait qu'on les étudie depuis longtemps. Dans le monde, seulement quatre essais cliniques ont été lancés : trois essais américains et le dernier français (lésions médullaires, DMLA, maladie de Stargardt,

insuffisance cardiaque). Un des trois essais américains a dû être arrêté compte tenu des faibles résultats. Cela place la France dans une position qui n'est pas si mauvaise malgré tout.

De plus, on ne peut raisonnablement pas accuser la restriction des lois françaises d'être à l'origine du retard en thérapie cellulaire, puisque celle-ci n'est pas fondée sur les cellules ES uniquement. En effet, la thérapie cellulaire, outre les cellules souches ES, comprend aussi la recherche sur les cellules différenciées, les cellules souches adultes (cellules souches hématopoïétiques et cellules souches mésenchymateuses en grande partie), les cellules de cordon ombilical, les cellules fœtales et bien sûr les cellules iPS.

Les chiffres parlent d'eux-mêmes, en montrant que la thérapie cellulaire n'a pas attendu les cellules ES et iPS pour se développer. Ainsi, depuis 2009, 112 essais cliniques utilisant des cellules souches hématopoïétiques CSH du cordon ombilical ont été effectuées dans le monde. Depuis octobre 2012, le réseau français de sang placentaire compte 11 banques opérationnelles et 70 maternités autorisées au prélèvement. Plus de 40 000 greffes ont été effectuées à travers le monde, pour traiter plus de 70 maladies différentes : leucémies, lymphomes, myélomes, aplasies médullaires, drépanocytose... Mais la France fait de la résistance pour des raisons inconnues et les banques publiques existantes sont encore très insuffisantes : le recueil ne couvre que 20% des naissances nationales et on a actuellement en France 7000 greffons provenant de cellules souches de cordon alors qu'il en faudrait 50 000 pour couvrir les besoins de la population française (Eliane Gluckman, 2013). Il faut donc importer les greffons manquant, pour un coût de 25 000€ au lieu de 2000€, et pour des standards de qualité parfois inférieurs à ceux imposés en France.

Les cellules souches mésenchymateuses CSM sont aussi porteuses d'espoirs, de par leur attrait en oncologie et dans les pathologies articulaires (arthrose du genou). Le registre France Greffe de Moelle rassemble 210 000 donneurs de moelle osseuse, permettant l'obtention de CSM, mais aussi de CSH utilisées dans des pathologies telles que les leucémies, la drépanocytose, l'anémie de Fanconi, ou encore la β -thalassémie. 36 essais cliniques utilisant des CSM sont actuellement en cours en Europe (www.clinicaltrialsregister.eu), et 351 essais à travers le monde terminés ou actuellement en cours (www.clinicaltrials.gov). Il est vrai que beaucoup s'accordent sur la faible reproductibilité de leur capacité de réparation, largement tributaire de l'âge du patient et des traitements médicamenteux que celui-ci continue à suivre. Malgré tout, ces cellules souches – CSH et CSM- offrent déjà de belles applications thérapeutiques mises en œuvre aujourd'hui.

Si toutefois on voulait profiter de la pluripotence des cellules souches pluripotentes, les cellules iPS sont une alternative encourageante n'ayant pas la contrainte éthique des cellules ES. Il est d'ailleurs étonnant de constater que l'élargissement de la loi autorisant la recherche sur les cellules ES intervient au moment même où une alternative pouvant rivaliser avec celles-ci apparaît. A croire que la condition « ne peut être menée par une méthode alternative d'efficacité comparable » a été oubliée. Au Japon, le NEDO (New Energy and Industrial Technology Development Organization) a annoncé en 2009 un budget total de 40 millions d'euros pour un programme sur 5 ans visant à développer des applications utilisant des cellules iPS. En Allemagne, c'est le BMBF (ministère fédéral de l'enseignement et de la recherche) qui a décidé en 2007 de doubler la subvention annuelle accordée aux recherches sur les techniques de reprogrammation des cellules adultes, passant à 12 millions d'euros. Enfin, le centre CARE (centre pour les technologies régénératives appliquées) à l'institut Max Planck de Münster a pour objectif de devenir une référence mondiale dans le domaine de la reprogrammation, et bénéficiera pour cela d'un budget de 80 millions d'euros entre 2010 et 2020. Cela montre bien l'attrait dont font l'objet les cellules iPS à l'étranger. La France ne risque-t-elle pas de prendre du retard dans ce domaine en consacrant du temps et de l'argent pour les cellules ES au détriment de cellules plus prometteuses et moins controversées ?

Nous remarquons cependant que l'étude des cellules iPS est moins avancée que celle des cellules ES du fait de leur découverte récente ; elles sont surtout plus chères à développer. De plus, les pays voisins utilisent largement les cellules ES, ce qui fait pression sur les chercheurs français s'ils veulent pouvoir être compétitifs. La concurrence internationale est une bonne chose lorsqu'elle permet d'inciter les chercheurs à se dépasser et à être efficaces, mais pas lorsqu'elle se fait au détriment de toute autre considération, éthique notamment. Un pays peut refuser de suivre le mouvement général s'il le considère comme en désaccord avec son éthique et ses principes fondamentaux, mais au vu des enjeux envisagés, il n'est pas certain que ces principes puissent résister à la pression de l'économie et de la concurrence internationale. Il est triste de constater que la recherche sur les cellules ES entre dans ce cas de figure, où elle se trouve autant motivée par les retombées financières et le prestige scientifique que par le progrès thérapeutique (Fagniez, 2006).

Pour finir, le Pr. Peschanski reconnaît que le régime dérogatoire de 2004 n'a pas gêné la recherche fondamentale. Elle gênait plutôt son développement industriel à long terme, et la loi de 2013 passant au régime d'autorisation encadrée avait justement pour but d'ouvrir le

champ à l'industrialisation et donc à l'utilisation de cellules ES à des fins industrielles et commerciales. La question est donc : pouvons-nous breveter des inventions utilisant des cellules ES ? Si nous distinguons ces cellules ES de l'embryon, elles peuvent être brevetées tout comme les cellules souches adultes. Mais considérant qu'elles provoquent directement la destruction des embryons, elles tombent sous la règle 28c de la Convention sur le Brevet Européen (CBE) interdisant les brevets de toute invention portant ou utilisant un embryon humain : « *les brevets européens ne sont pas délivrés notamment pour les inventions biotechnologiques qui ont pour objet : [...] des utilisation d'embryons humains à des fins industrielles ou commerciales.* ». De plus, ces cellules peuvent aussi tomber sous l'interdiction de brevetabilité pour contrariété à l'ordre public ou aux bonnes mœurs (article L.611-17, Code de la propriété intellectuelle).

5) Une éthique qui suit l'évolution de la société

a) L'eugénisme de la nature

Le Pr Georges David, professeur de la biologie de la reproduction, a fait remarquer que « *le souci d'éviter l'emploi de l'embryon pré-implantatoire en tant que matériel de recherche va jusqu'à préférer sa destruction, en cas d'abandon parental, à une utilisation qui [...] permettrait d'approfondir utilement nos connaissances sur cette particularité de notre espèce : le formidable taux de vices de conformation, vices cachés dans les conditions normales par les soins d'une nature se chargeant d'une impitoyable et rapide élimination* ». Georges H.Werner ajoute à cela que « *c'est bien la nature, et non la médecine, qui fait là preuve d'un eugénisme assez radical !* ». Georges H.Werner ne semble pas avoir une définition précise de l'eugénisme. Celui-ci peut être défini comme « l'ensemble des méthodes et pratiques visant à intervenir sur le patrimoine génétique de l'espèce humaine, dans le but d'améliorer la race humaine ». La nature ne peut donc pas être eugénique puisque l'eugénisme provient d'une intervention humaine. De plus, l'eugénisme vise à améliorer l'espèce humaine, ce que ne font pas les avortements spontanés ou fausses couches : ils interviennent de façon naturelle dans le seul cas d'un embryon non viable. L'espèce humaine ne retire pas d'amélioration par l'intervention de ces fausses couches puisque celles-ci ne suppriment ni les malformations ni les pathologies.

b) L'embryon : un donneur d'organe ?

Mais la question du Pr Georges David est légitime. Puisque les embryons surnuméraires sont destinés à être jetés, pourquoi ne pas les utiliser plutôt pour la recherche, donnant ainsi un sens à leur destruction ? Ceux défendant cette vision affirment comparer l'embryon à un donneur d'organe. Mais la comparaison n'est pas tout à fait exacte : l'embryon ne peut être comparé à un donneur vivant, puisqu'il faut détruire l'embryon pour obtenir des cellules ES, et cela sans son consentement. Et il ne peut pas non plus être comparé à un donneur décédé puisque l'embryon est vivant avant le prélèvement, et c'est le prélèvement lui-même qui occasionne la destruction de l'embryon.

c) Moment où l'embryon acquiert une dignité

L'article 16 du Code Civil (« *La loi assure la primauté de la personne, interdit toute atteinte à la dignité de celle-ci et garantit le respect de l'être humain dès le commencement de sa vie* ») insiste bien sur la dignité de la personne, intrinsèque à tout être humain. Mais depuis le développement de l'embryologie, la notion de « commencement de la vie » devient floue. Comment déterminer avec précision le moment où l'embryon a droit à une dignité ? Pour certains scientifiques, utiliser des embryons de quelques jours, non implantés et sans projet parental ne pose pas de problèmes éthiques. Pour ceux-ci, l'embryon n'est pas une personne dès sa conception, c'est-à-dire au moment où il gagne un code génétique unique, mais il acquiert son humanité au cours des stades successifs de son développement.

Pour certains embryologistes, l'embryon devient une personne lorsqu'il acquiert une crête neurale (ébauche du système nerveux et de la conscience). Pour d'autres comme le Pr Michel Veckemans, généticien, c'est à partir de l'apparition du troisième feuillet, le mésoderme, indispensable à son développement, que l'on peut donner la dignité de personne à l'embryon. Pour le Pr René Frydman, gynécologue, comme pour d'autres, enfin, la phase charnière se situe à l'implantation *in utero*, étape déterminante pour son devenir et sa qualification de personne humaine. Le projet parental serait donc déterminant : seul l'embryon ayant un projet parental sera implanté et acquerra le statut de personne humaine. Malheureusement, personne n'apportera la preuve nous permettant de trancher, et tous ces avis ne resteront que des avis. Non, il n'est pas possible de déterminer le moment précis où

l'embryon devient une personne. Il nous faut pourtant trancher, car on ne peut se contenter d'un flou sur la nature de l'embryon, alimentant l'incohérence des lois et la façon arbitraire de les gérer. De nombreux stades successifs ont été décrits par les embryologistes, mais le choix de l'une ou l'autre étape diffère grandement pour chaque scientifique. La difficulté provient du fait que le développement embryonnaire se fait dans un continuum de la fécondation à la naissance, et même plus loin encore.

Pour contenter tout le monde et ne pas freiner la recherche, on devrait donner la qualité de personne humaine à la naissance. Mais cela ne convainc personne : comment accepter de faire des recherches sur des embryons entièrement formés, dont la vie a déjà commencé *in utero* depuis bien longtemps ? La seconde solution alors serait de considérer la dignité de l'embryon à partir du moment où il acquiert son identité propre, c'est-à-dire au moment de la conception. Mais cela signifierait renoncer aux recherches et aux découvertes que l'on pourrait faire grâce à ces embryons. Cela annoncerait une grande perte économique : celle des investissements engagés sur ces recherches jusqu'à aujourd'hui, et celle à venir due à la concurrence internationale. Ainsi, le statut actuel que l'on a donné à l'embryon ne provient pas de sa nature intrinsèque, mais des besoins de la recherche, de l'économie et de la compétitivité française.

D'après Aude Mirkovic, maître de conférence en droit privé, la qualité de personne ne relève pas de l'opinion, mais d'un constat, indépendant de toute subjectivité : la qualité de personne est intrinsèque aux individus. A cela il faut distinguer la personne juridique, qui est une qualité attribuée aux individus par le droit, donc déterminée subjectivement par le législateur. On peut choisir d'attribuer ou non la personnalité juridique à l'embryon, mais la qualité de personne humaine ne se décide pas, on peut juste la chercher objectivement. Or, des éléments de réponse ont déjà été apportés par le CCNE : *« On ne peut nier que l'embryon créé soit de nature humaine, comme le montre à l'évidence son caractère non substituable. Quelles que soient nos convictions ontologiques quant au statut de l'embryon, même si l'on admet qu'il ne s'agit pas d'une personne en acte, nous ne pouvons nier son caractère humain. »* L'embryon est donc reconnu comme étant un être humain, ce qui est suffisant pour constater que sa nature n'est pas du domaine de l'objet, l'embryon n'est pas une chose. En sachant cela, reste à savoir s'il faut lui donner le statut de personne juridique en accord avec son caractère humain, ou le lui refuser, au nom des principes fondant la pratique médicale que nous allons voir par la suite.

6) Ethique et principes d'une bonne pratique

a) Le rôle de l'éthique

On a ainsi réussi à modifier l'éthique afin de l'adapter à ces besoins essentiels. Nous pouvons nous demander si l'éthique doit prendre en compte tous les avantages et les inconvénients qui résulteront de ces décisions, ou bien si elle doit se contenter de se prononcer sur le bien-fondé d'une action en elle-même sans se préoccuper des conséquences. L'éthique, du grec *ethikos*, morale, et de *ethos*, mœurs, se donne pour but d'indiquer comment les êtres humains doivent se comporter, agir et être, entre eux et envers ce qui les entoure. Elle vise à répondre à la question « Comment agir au mieux ? ». Elle est à bien distinguer de la loi : l'éthique inspire et précède l'établissement des lois. Mais toutes les lois ne sont pas inspirées par l'éthique : un acte peut être légal mais non conforme à l'éthique (comme l'achat d'un objet fabriqué par un esclave), tout comme un acte peut être illégal mais conforme à l'éthique (l'assistance à un réfugié politique). L'éthique déontologique considère qu'une action est bonne ou mauvaise en elle-même, indépendamment de toute influence extérieure, qu'elle soit sociétale, économique, politique... Elle s'oppose à l'utilitarisme qui ne juge une action que sur les conséquences qu'elle entraîne : ce qui est « utile » est donc bon. Dans le domaine de la bioéthique, beaucoup de choses peuvent être utiles, et pourtant très mauvaises (les juifs étaient très utiles aux nazis pour progresser en médecine, mais il n'y a aucune éthique dans ce type de comportement), tout comme une pratique peut avoir de très bonnes conséquences, mais être fondamentalement mauvaise. Comme nous le rappelle l'ABM : « *Tout ce qui est médicalement possible est-il nécessairement moralement, socialement, humainement exigible ?* ». Il nous faut donc regarder uniquement si l'acte est en lui-même bon ou mauvais, et non pas les avantages que l'on pourrait en retirer.

b) Les principes fondant la pratique médicale

Les cellules ES n'ont pas encore d'applications réelles, mais les scientifiques espèrent bien pouvoir traiter des maladies aujourd'hui incurables par ces cellules. L'avancée thérapeutique serait alors énorme, et permettrait de soigner de nombreux patients, aujourd'hui sans espoir de guérison. C'est ce qu'exprime le député Roger-Gérard Schwartzberg, ancien ministre de la recherche 2000-2002 : « *L'objectif est de mettre fin à l'interdiction de principe, qui persiste dans l'actuelle loi de bioéthique de 2011, car elle est préjudiciable aux malades, et auprès des chercheurs qui veulent développer les techniques d'une médecine*

régénératrice. ». Pour lui, le devoir de soulager la souffrance et la liberté de la recherche prévaut sur le respect de l'embryon. De même, le Comité Consultatif National d'Éthique (CCNE), bien qu'affirmant la nature humaine de l'embryon et le reconnaissant comme « *une personne humaine potentielle, dont le respect s'impose à tous* » (avis n°1 du 22 mai 1984), admet la réalité et la nécessité des recherches sur l'embryon. Mais l'Agence de la Biomédecine se pose la question de savoir si l'éthique médicale a encore un sens si nous décidons par avance que nous pouvons faire tout ce qui est techniquement possible à partir du moment où l'argument thérapeutique peut être invoqué. Non, il est évident que l'argument thérapeutique seul ne suffit pas. C'est pourquoi le groupement européen d'éthique des sciences et des nouvelles technologies (GEE) rappelle les principes orientant la réflexion et la prise de décision des instances européennes :

- respect de la dignité humaine,
- principe du consentement,
- principe de bienfaisance (amélioration et protection de la santé),
- liberté de la recherche,
- proportionnalité entre moyens utilisés pour la recherche et buts poursuivis.

Si on applique ces principes à l'autorisation de la recherche sur l'embryon, pouvons-nous affirmer qu'ils sont tous respectés ? La liberté de la recherche, droit fondamental de tout chercheur et condition indispensable au progrès, est respectée. Si les recherches sont menées rigoureusement et mènent à une thérapie dont le rapport bénéfice/risque est favorable, alors le principe de bienfaisance est respecté. Mais concernant les deux premiers principes, celui du respect de la dignité humaine et celui du consentement, tout dépend de la nature de l'embryon. En effet, si l'embryon est une chose, tous les principes sont respectés, mais s'il est une personne, ces deux principes ne sont pas respectés, et dans ce cas, la pratique ne peut être légiférée.

c) Le rapport bénéfice/risque

La question qui se pose lorsque l'on met en balance les principes guidant la pratique médicale concerne les bénéfices que l'on pourrait tirer des recherches sur ces cellules : l'emportent-ils sur les préjudices que l'utilisation de cellules ES pourraient entraîner ? Quels droits prévalent : ceux d'un adulte mourant ou ceux d'un embryon congelé de quatre jours ?

La médecine est un risque. C'est pour cela qu'il faut toujours évaluer le rapport bénéfice/risque que l'on retire de ces recherches. Ce rapport repose sur quatre ordres de probabilités (David, 2007) :

- *les risques de la maladie* : le handicap généré dépend de la maladie ciblée (insuffisance cardiaque, DMLA, lésions médullaires, Parkinson, Huntington etc...).
- *les effets bénéfiques escomptés de la thérapie* : difficiles à évaluer tant que la thérapie n'est pas au point. Pour le moment, les seuls tests effectués lors des quatre essais cliniques utilisant des cellules ES autorisés sont ceux de l'innocuité. L'efficacité des thérapies n'a pas été suffisamment étudiée pour pouvoir permettre une application effective dès aujourd'hui.
- *les effets indésirables de cette thérapie* : ceux du traitement immunosuppresseur à vie, et ils sont nombreux (infections virales, bactériennes et fongiques, insuffisance rénale, cancer, toxicité neurologique, complications métaboliques, hypertension, ostéoporose), mais aussi le risque de rejet, et le risque de formation de tumeur. Les techniques doivent garantir une totale innocuité si elles veulent pouvoir être utilisées un jour.
- *et enfin le risque concernant l'embryon* : la probabilité que l'embryon soit une personne n'est pas évaluable, mais le risque encouru n'est d'aucune commune mesure : celui de tuer une personne humaine.

Avec l'avancée de nos recherches aujourd'hui, les trois derniers points font pencher la balance vers un risque plus important que les bénéfices. C'est pour cela qu'aucune thérapie à base de cellules ES n'est encore utilisée dans les protocoles de soins et que de nombreux tests sont encore nécessaires pour faire pencher la balance. Dans quelques années, nul doute que les techniques permettront une innocuité et une efficacité permettant leur utilisation dans les protocoles de soins. Mais n'oublions pas le dernier point. Quelle que soit le bénéfice retiré de cette thérapie, cela ne pourra jamais justifier le risque qui est de porter atteinte à une vie. Le rapport bénéfice/risque est donc défavorable dans le cas qui nous occupe.

d) Le principe de précaution

Selon certains, personne ne pourra jamais trancher de façon certaine sur le fait que l'embryon est une personne ou non. On pourrait simplement se contenter de *croyances*, tout

au plus de *convictions*, mais jamais de *certitude*. Quoiqu'il en soit, au vu de la gravité de la conséquence de la recherche sur l'embryon –la destruction de cet embryon-, nous avons le devoir d'appliquer le **principe de précaution** selon la formule : *Primum non nocere*, premièrement, ne pas nuire. Ce principe de précaution n'est pas une conception philosophique mais bien une norme juridique située au niveau le plus élevé de la hiérarchie des normes.

Le risque zéro n'existant pas en médecine, il ne peut justifier à lui seul le recours au principe de précaution. C'est pourquoi, transposé au champ de la médecine, le principe de précaution doit être discuté en regard des autres logiques vues plus haut. 1) Les principes fondant la pratique médicale : liberté de la recherche, principe de bienfaisance, mais aussi consentement et respect de la dignité humaine. Nous avons vu que ces principes ne sont respectés qu'à moitié s'il s'avérait que l'embryon était une personne. 2) La notion d'incertitude et celle de balance bénéfice/risque : là encore, cette balance est défavorable, encore plus si l'embryon est considéré comme une personne. 3) Enfin, il doit répondre aux trois critères fondant le principe de précaution lui-même (Moutel, 2002) :

- *l'évaluation des données scientifiques disponibles* : il existe un continuum entre l'embryon et la personne adulte ;
- *l'étendue de l'incertitude scientifique* : l'embryon est humain, c'est incontestable, qu'on décide ou non par la suite de le considérer comme une personne ou pas ;
- *l'identification des effets potentiellement négatifs*, dans ce cas extrêmement négatifs : la mort d'une personne si l'embryon est une personne, en tout cas d'un humain.

Ces trois critères mettent en évidence que l'on peut raisonnablement, et même que l'on doit appliquer le principe de précaution à la recherche sur l'embryon, quelques soient nos convictions. Certes, renoncer à la recherche sur l'embryon demande beaucoup de courage et de force pour sacrifier les avantages économiques que cela pourrait procurer, pour avancer à contre-courant de la concurrence internationale et contre le désir des chercheurs. Mais si l'on veut que la médecine serve l'homme et non l'inverse, on ne peut se permettre un tel risque sur la vie humaine quand on ne peut même pas dire si l'embryon est une personne ou pas. « Ce n'est sûrement pas une personne » ne peut suffire, quand bien même on serait sûr à 99%, tant la conséquence est d'importance.

B. Problèmes éthiques posés par les cellules iPS

Un grand nombre de scientifiques s'accordent à dire que les cellules iPS apportent une alternative éthique aux cellules ES. Il est vrai que l'obtention de cellules iPS ne nécessite pas la destruction d'embryons. Mais cela ne signifie pas qu'elles sont libres de toute considération éthique. Les problèmes sont autres, tout simplement.

1) Vie privée

Les cellules iPS présentent la particularité d'offrir une « médecine personnalisée », c'est-à-dire qu'elles peuvent être produites à partir du patient lui-même, et donc lui être génétiquement identique. Mais le fait qu'elles soient génétiquement identiques au patient peut justement porter atteinte à la vie privée de celui-ci. En effet, le chercheur a à sa disposition des cellules du patient, ce qui lui permet d'obtenir des informations sur sa santé, présente et à venir, et même sur celle de sa famille. Le cas est d'ailleurs le même pour un simple don de sang ou une biopsie de peau, puisque l'ADN peut être isolé à partir de n'importe quelle cellule du corps. On pourrait imaginer que les compagnies d'assurance, en prenant compte de renseignements prédictifs concernant un donneur, pourraient lui refuser une assurance ! Il faut donc bien s'assurer que les chercheurs protègent ces informations pour qu'elles ne soient pas utilisées à des fins discriminatoires pouvant nuire au donneur : c'est le rôle de la loi n° 2004-801 du 6 août 2004 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel.

2) Consentement éclairé

Le consentement éclairé avant un don est spécifié par la loi L.1211-2 CSP : « *Le prélèvement d'éléments du corps humain et la collecte de ses produits ne peuvent être pratiqués sans le consentement préalable du donneur. Ce consentement est révocable à tout moment* ». Le problème qui se présente ici est que les cellules iPS ont des potentialités telles qu'il n'est pas possible de prédire à l'avance toutes les utilisations que l'on va en faire. Comment alors libeller le consentement lorsque l'on ne peut même pas dire à quoi vont servir exactement les cellules prélevées du patient une fois reprogrammées ? Une solution serait d'obtenir un consentement large, c'est-à-dire que le donneur accepterait toutes les utilisations futures inconnues des cellules données. Mais un consentement trop large le viderait de son

utilité : « consentir à tout » n'a aucun sens éthique. Par conséquent, il faudrait réussir à trouver un équilibre entre un consentement pas trop large, mais toutefois assez large pour couvrir les usages non anticipés de tissus humains. La solution est d'informer les donneurs des usages potentiels qui seront faits à partir de leurs cellules, ce que notifie la loi par la formule « *après avoir reçu une information sur les finalités de cette utilisation* ».

Deuxièmement, la loi prévoit le retrait du consentement à tout moment. Mais cela s'avère extrêmement difficile avec les cellules iPS, puisque celles-ci engendrent des lignées qui pourront être utilisées dans de nombreuses études scientifiques et divers laboratoires. Si le donneur venait à retirer son consentement, il faudrait stopper toutes les recherches en cours utilisant ces cellules, ce qui est bien sûr impossible. La loi L.1241-1 précise donc bien « *Ce consentement est révocable sans forme et à tout moment tant que le prélèvement n'est pas intervenu* ».

3) Innocuité et efficacité des traitements

La technique de reprogrammation est loin d'être parfaite. Il faut laisser le temps aux chercheurs d'améliorer la qualité des cellules reprogrammées, l'efficacité des techniques, la durée de vie des cellules, la prise effective des greffes, etc... Certains scientifiques dénoncent la rapidité avec laquelle se développent les cellules iPS, en invoquant non une raison thérapeutique, mais économique. Il est reporté dans le journal japonais Asahi Shimbun que certains scientifiques pensent que les techniques n'ont pas eu le temps de prouver leur efficacité lors des essais pré-cliniques qu'elles sont déjà propulsées vers les essais cliniques, tel que celui du Pr Takahashi. Les scientifiques regrettent que les essais pré-cliniques ne soient pas publiés, rendant opaque les résultats susceptibles d'éclairer sur la pertinence de débiter les essais cliniques ou non. Et c'est bien la santé des patients qui est mise en jeu, mettant en péril leur vie si la thérapeutique n'a pas eu le temps d'être suffisamment contrôlée lors des essais sur les animaux. Le problème touche bien sûr les cellules ES également, mais au Japon, le budget alloué à la recherche sur les cellules iPS est tel que les attentes de ce côté sont énormes. Par conséquent, il faudra veiller à ce que la pression économique n'influe pas sur les résultats et le temps qu'il faudra pour les obtenir.

4) Potentialités

Le problème éthique le plus important soulevé par les cellules iPS concerne ce que l'on prévoit d'en faire. En effet, ces cellules ont une telle potentialité que nous pouvons donner libre cours à notre imagination. Tout d'abord, les cellules iPS –tout comme les cellules ES- peuvent tout à fait être différenciées en gamètes –spermatozoïde et ovocyte- et être utilisés pour développer un embryon (Hamamah, 2010). Le problème retombe alors sur celui de l'utilisation des embryons à des fins de recherche. Deuxièmement, l'équipe de M.Abad a remarqué que lorsque l'on injecte des cellules iPS marquées à la GFP (green fluorescent protein) dans une morula, les blastocystes dérivant de cette morula contenaient des cellules fluorescentes aussi bien dans la masse interne (futur embryon) que dans le trophoctoderme (structure extra-embryonnaire) et le placenta plus tard (Abad et al, 2013). Cela signifie que lors de certaines procédures de reprogrammation, la cellule remonte trop loin, jusqu'au stade totipotent c'est-à-dire le stade capable de donner un embryon entier : les 3 feuillets embryonnaires, le trophoctoderme ainsi que le sac vitellin. Si cela était effectivement possible, il faudrait alors s'inquiéter des grandes dérives que cela pourrait entraîner. Pourquoi ne pas imaginer aussi, dans un futur plus lointain, que l'homme réussisse à faire rajeunir ses cellules par la technique de la reprogrammation, et ainsi atteindre l'immortalité ? On est bien sûr dans le domaine de la science fiction, mais les progrès allant tellement vite, il est bien de réfléchir dès maintenant aux conséquences des découvertes à venir, afin de construire un monde à l'image de notre humanité, et non de notre technicité.

C. Conclusion

Nous comprenons à présent les problèmes éthiques que soulèvent les cellules souches pluripotentes et les dangers qu'elles peuvent occasionner. C'est pourquoi il faut rester vigilant sur leur utilisation et sur l'objectif que l'on veut se donner. Il est vrai que ces cellules extraordinaires peuvent conduire à de fortes avancées scientifiques et thérapeutiques et qu'elles pourraient permettre à la France de se placer en bonne position sur la scène internationale. Toutefois il faut réfléchir dès maintenant aux conséquences que les cellules iPS peuvent occasionner et travailler à la réglementation de leur utilisation avant d'aller plus loin. Quant aux cellules ES, décider de ne plus les utiliser demande un courage et un renoncement en effet difficile. Mais la science doit-elle progresser à n'importe quel prix ? Comme le dit si bien Emmanuel Kant : « *Agis de telle sorte que tu traites l'humanité comme une fin, et jamais simplement comme un moyen.* ».

CONCLUSION

Ces dernières années, la compréhension des mécanismes menant à la pluripotence ont permis de répondre à de nombreuses questions concernant les cellules ES et iPS. Bien que certaines différences génétiques et épigénétiques aient été relevées, la pluripotence de ces deux types de cellules n'a jamais été aussi proche, et les chercheurs s'en rapprochent encore avec l'amélioration des techniques de reprogrammation, par le triple choix des cellules à reprogrammer, des facteurs de reprogrammation et de la méthode de vectorisation.

Les cellules souches pluripotentes sont déjà un outil précieux pour la recherche, pour la modélisation, le criblage et la toxicologie. De nombreuses questions sont encore à résoudre pour pouvoir utiliser ces cellules avec succès en thérapie. Les essais cliniques basés sur ces cellules viennent tout juste de commencer, notamment dans les domaines de la neurologie, de l'ophtalmologie et de la cardiologie. Les espoirs sont grands dans de nombreux autres domaines.

Mais avant de poursuivre, les chercheurs ne doivent pas se passer de prendre un peu de recul sur ces pratiques. Nous avons vu qu'avec l'amélioration des techniques, les cellules iPS peuvent de plus en plus prétendre à remplacer les cellules ES. Certes, les cellules iPS coûtent plus cher, mais ceci est compensé par l'absence de réponse immunologique et de problèmes éthiques. Ces problèmes éthiques sont d'importance si l'on veut une science qui soit capable de respecter certaines limites, notamment lorsque des risques touchant à la vie humaine apparaissent. Au début de cette nouvelle thérapie cellulaire, ne nous laissons pas emporter et gardons en tête le rôle de toute science : servir l'homme et non pas se servir de l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

- www.bioethique.net/que-faire-des-embryons-congeles/ consulté le 26/07/2014
- www.ccne-ethique.fr consulté le 29/08/2014
- www.chu-toulouse.fr/-la-congelation-d-embryons-#art777 consulté le 26/07/2014
- www.clinicaltrials.gov/ consulté pour la dernière fois le 02/09/2014
- www.clinicaltrialsregister.eu/ consulté pour la dernière fois le 02/09/2014
- www.dondemoelleosseuse.fr/ consulté le 02//09/2014
- www.eurostemcell.org consulté pour la dernière fois le 02/09/2014
- www.fivfrance.com/page_protocoles.html consulté le 26/07/2014
- www.inserm.fr consulté pour la dernière fois le 02/09/2014
- www.ipscell.com consulté le 04/08/2014
- www.orpha.net consulté le 02/08 :2014
- www.senat.fr consulté le 23/08/14
- www.u-psud.fr/fr/news/page_2007/cellules_souches_embryonnaires.html consulté le 26/07/2014

Vidéo-conférence : Eliane Gluckman - Cordons, source de vie, 2013

Association monégasque Cordons de vie, 2013

Convention sur le Brevet Européen. 15ème édition, septembre 2013

Aasen T, Raya A, Barrero M.J, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G et al. Nat. Biotechnol 2008 ; 26 : 1276–1284

Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, Canamero M, Rayon T, Ors I, Grana O, Megias D, Dominguez O, Martinez D, Manzanares M, Ortega S, et Serrano M. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. Nature 2013 ; 502 : 340-345

Al-Hasani K, Pfeifer A, Courtney M, Ben-Othman N, Gjernes E, Vieira A, Druelle N, Avolio F, Ravassard P, Leuckx G, Lacas-Gervais S, Ambrosetti D, Benizri E, Hecksher-Sorensen J, Gounon P, Ferrer J, Gradwohl G, Heimberg H, Mansouri A, Collombat P. Adult duct-lining cells can reprogram into β -like cells able to counter repeated cycles of toxin-induced diabetes. Developmental cell 2013 ; 26 : 86-100

Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, and Itskovitz-Eldor J. Human feeder layers for human embryonic stem cells. Biol Reprod 2003 ; 68, 2150-2156

Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ishisaka T, Okita K, Takahashi K et al, Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008 ; 321 : 699-702

Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, Sugiura M, Ideno H, Shimada A, Nifuji A, et Abe M. *Nature* 2013 ; 494 : 100–104

Aubry L, Bugi A, Lefort N, Rousseau F, Peschanski M, et Perrier A. Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 16707-16712

Bachoud-Lévi A-C, Bourdet C, Brugières P, Nguyen J-P, Grandmougin T, Haddad B, Jény R, Bartolomeo P, Boissé M-F, Dalla Barba G, Degos J-D, Ergis A-M, Lefaucheur J-P, Lisovoski F, Pailhous E, Rémy P, Palfi S, Defer G.L, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M. Safety and tolerability assessment of intrastriatal neural allografts in five patients with Huntington's disease. *Experimental Neurology* 2000 ; 161 : 194-202

Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, Pucéat M. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J.* 2002 ; 16 :1558-1566

Anders Björklund, Stephen B Dunnett, Patrik Brundin, A Jon Stoessl, Curt R Freed, Robert E Breeze, Marc Levivier, Marc Peschanski, Lorenz Studer, et Roger Barker. Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* 2003 ; 2 : 437-445

Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith Z.D, Ziller M, Croft G.F, Amoroso M.W, Oakley D.H, et al. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 2011 ; 144 : 439–452

Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO) : initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2011; 378 : 1847-1857

Brault J. Vers la modélisation physiopathologique de la granulomatose septique chronique pour de nouvelles approches thérapeutiques. Développement de la culture des cellules souches pluripotentes induites issues de fibroblastes de patients. Thèse 2013. 144p.

Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, Nelson M, Sanger WG, Gokhale S, et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature.* 2007 ; 450 : 497-502.

Cao FJ, Feng SQ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and the treatment of spinal cord injury. *Chin Med* 2009 ; 122 : 225-231

Chen A.E, Egli D, Niakan K et al. Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines. *Cell Stem Cell* 2009 ; vol. 4, no. 2 : 103–106

Chin M.H, Mason M.J, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimiwu O, Richter L, Zhang J, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 2009 ; 5 : 111–123

Collombat P, Mansouri A. Conversion de cellules alpha pancréatiques en cellules bêta. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 763-765

Couderc B. Les iPSC (induced pluripotent stem cells ou cellules pluripotentes induites) sont-elles vraiment éthiques ? *IPLH. Mémoire* 2014 ; 55p.

Coulombel L. Cellules souches adultes : intérêt scientifique et avenir thérapeutique. *Adult stem cells : their scientific interest and therapeutic future. ScienceDirect* 2007 ; *Gynécologie obstétrique et Fertilité* 35 : 806-810

Coulombel L. Pluripotence : une définition à géométrie variable. *Médecine/Sciences* 2009 ; vol 25, n°10 : 798, 801

Coulombel L. Cellules souches : un seul nom pour de multiples entités. *Revue Francophone des Laboratoires* décembre 2010 ; 427 : 29-38

Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005 ; 309 : 1369-1373

David G. Risques et principe de précaution en matière médicale. <http://www.asmp.fr/> 2007

Deda H, Inci MC, Kürekçi AE, Kayihan K, Ozgün E, Ustünsoy GE, Kocabay S. Treatment of chronic spinal cord injured patients with autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: 1-year follow-up. *Cytotherapy* 2008 ; 10 : 565-574

Deng J, Shoemaker R, Xie B, Gore A, LeProust E.M, Antosiewicz-Bourget J, Egli D, Maherali N, Park I.H, Yu J, et al. Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat. Biotechnol* 2009 ; 27 : 353–360

Denis JA. Applications médicales et pharmaceutiques des cellules souches pluripotentes : vers un changement de paradigme ? *Thèse* 2011. 94p.

Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K: Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008, 321 : 1218–1221

Dhodapkar KM, Feldman D, Matthews P, Radfar S, Pickering R, Turkula S, Zebroski H, Dhodapkar MV. Natural immunity to pluripotency antigen OCT4 in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 ; 107 : 8718-8723

Doi D, Morizane A, Kikuchi T, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Motoono M, Sasai Y, Saiki H, Gomi M, Yoshikawa T, Hayashi H, Shinoyama M, Refaat MM, Suemori H, Miyamoto S, Takahashi J. Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and the dopaminergic function of human ESC-derived neural cells in a primate model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2012 ; 30 : 935-945

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. juillet 1981 ; 292 :154-156

Fagniez P-L : Cellules souches et choix éthiques. CCNE 2006, 242p.

Faure-André G. Brevetabilité des lignées de cellules souches embryonnaires humaines. Regimbeau 2013 ; 3p.

Germain D, Les cellules souches pluripotentes induites. Pathologie Biologie. 2009 ; 57 : 555-559

Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodriguez-Piza I, Vassena R, et al. G Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. Cell Stem Cell . 2009 ; 5 : 353-357.

Gonzalez F, Barragan Monasterio M, Tiscornia G, Montserrat Pulido N, Vassena R, Batlle Morera L, et al. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. Proc Natl Acad Sci USA 2009 ; 106 : 8918-8922

Graf T, Enver T. Forcing cells to change lineages. Nature 2009 ; 462 : 587-594

Guha P, Morgan J.W, Mostoslavsky G, Rodrigues N.P, et Boyd A.S. Cell Stem Cell 2013 ; 12 : 407-412

Guan K, Nayernia K, Maier LS, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. Nature 2006 ; 440 : 1199-1203

Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, del Rio M, Barrault C, Bernard F-X, Peschanski M, Baldeschi C, Waksman G. Human embryonic stem cells derivatives enable full reconstruction of the pluristratified epidermis. The Lancet 2009 ; 374 : 9703

Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. J. Embryol. Exp. Morphol 1962 ; 10 : 622-640

Hamamah S. De la cellule pluripotente au gamète artificiel. 2010. 4p.

Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Weming M et al. Direct reprogramming of terminally mature B lymphocytes to pluripotency. Cell 2008 ; 133 : 250-264

Haruta M, Sasai Y, Kawasaki H, Amemiya K, Ooto S, Kitada M, Suemori H, Nakatsuji N, Ide C, Honda Y, Takahashi M. In Vitro and In Vivo Characterization of Pigment Epithelial Cells Differentiated from Primate Embryonic Stem Cells. Invest. Ophthalmol Vis. Sci. 2004 ; 45 : 1020-1025

Heins N, Englund MC, Sjoblom C, Dahl U, Tønning A, Bergh C, Lindahl A, Hanson C, and Semb H. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. Stem Cells 2004 ; 22, 367-376

Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W et al, Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. Nat Biotechnol 2008 ; 26 : 1269-1275

Itoh M, Kiuru M, Cairo MS, Christiano AM. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ;108 : 8797-8802.

Jaenisch R, Young R, et al. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 2008 ; 132 : 567-582

John De Vos. Transdifférenciation induite : la plasticité cellulaire revisitée. *Med Sci* 2010

Kaneko S. et Yamanaka S. To be immunogenic, or not to be: that's the iPSC question. *Cell Stem Cell* 2013 ; 12 : 385-386

Kanemura H, J.Go M, Shikamura M, Nishishita N, Sakai N, Kamao H, Mandai M, Morinaga C, Takahashi M, Kawamata S. Tumorigenicity Studies of Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Retinal Pigment Epithelium (RPE) for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *Plos one* 2014 ; Volume 9, 11p.

Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K et Steward O. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience* 2005 ; 25 : 4694-4705

Kieffer E, Kuntz S, Viville S. Tour d'horizon de cellules souches pluripotentes. *Médecine/Sciences* 2010 ; 26 : 848-854.

Kim HS, Oh SK, Park YB, Ahn HJ, Sung KC, Kang MJ, Lee LA, Suh CS, Kim SH, Kim DW *et al.* Methods for derivation of human embryonic stem cells. *2005 Stem Cells* 23, 1228-1233

Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko, K, Sebastiano V et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008 ; 454 : 646-650

Kim K, Doi A, Wen B, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010 ; 467 : 285-290.

King TJ, Briggs R. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1952 ; 38 : 455-463

Laustriat D. Les cellules souches pluripotentes en modélisation pathologique pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques : application à la Dystrophie Myotonique de type 1. Thèse 2010. 155p.

Lemonnier T. Modélisation de maladies neurodégénératives à l'aide de cellules souches pluripotentes induites humaines. Thèse 2012. 309p.

Liang J, Zhang H, Hua B, Wang H, Wang J, Han Z, Sun L. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009 ; 15 : 644-646

Liao J, Wu Z, Wang Y, Cheng L, Cui C, Gao Y, et al. Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res.* 2008 ; 18 : 600-603

Magill G. et Neaves W.B. Ontological and ethical implications of direct nuclear reprogramming. *Kennedy. Inst Ethics J* 19 ; 2009. 23-32

Martin GR Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* déc 1981 ; 78 :7634-7638.

Meissner, A. and R. Jaenisch. Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts. *Nature* 2006 ; 439 : 212-215

Menasché P, A.Hagège A. Cellular cardiomyoplasty : a new hope in heart failure ? *Heart* 2000 ; 84 : 465-466

Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagège AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008 ; 1189-1200

Menasché P, Vanneaux V, Fabreguettes JR, Bel A, Tosca L, Garcia S, Bellamy V, Farouz Y, Pouly J, Damour O, Périer MC, Desnos M, Hagège A, Agbulut O, Bruneval P, Tachdjian G, Trouvin JH, Larghero J. Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. *Eur Heart J.* 2014. pii: ehu192.

Miao Q, Shim W, Tee N, Yun Lim S, Chung YY, Mia Ja M, Huay Ooi T, Tan G, Kong G, Wei H, Hee Lim C, Sin YK, Wong P. iPSC-derived human mesenchymal stem cells improve myocardial strain of infarcted myocardium. *Journal of Cell Mol Med.* Juin 2014 ; 11p.

Miller RA, Ruddle FH. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell* 1976 ; 9 : 45-55

Moutel G. Principe de précaution en médecine : avantages, risques et nécessité de prendre en compte les acquis de l'éthique médicale dans l'élaboration du droit de la santé. <http://www.ethique.sorbonne-paris-cite.fr/> 2002, 22p.

Nissan X, Lemaitre G, Peschanski M, Baldeshi C. Les cellules souches pluripotentes font peau neuve. *Médecine/Sciences* 2012 ; vol 26, n°1 : 5-8

Okita K, Nagata N et Yamanaka S. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Circulation Research* 2011 ; 109 : 720-721

Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008 ; 134 : 877-886

Peschanski M. Cellules souches – médecine régénératrice. Vecteur d'innovation – Ruptures. Janvier 2010 ; 123-124

Piccini P, J. Brooks D, Björklund A, Roger N. Gunn1, M. Grasby P, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehncrona S, WidnerH et Lindvall O. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. Nature neuroscience 1999 ; 12 : 1137-1140

Pincus DW, Keyoung HM, Harrison-Restelli C, Goodman RR, Fraser RA, Edgar M, Sakakibara S, Nedergaard M, Okano H, Goldman SA. Fibroblast growth factor-2/brain-derived neurotrophic factor-associated maturation of new neurons generated from adult human subependymal cells. Ann Neurol 1998, 43 : 576–585

Okano H and Yamanaka S. iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. Molecular Brain 2014 ; 7 : 22. 12p.

Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science 2008 ; 322 : 949-953

Okita K, Yamanaka S. Induction of pluripotency by defined factors. Experimental Cell Research 2010 ; 2565-2570

O'Malley J, Woltjen K, et Kaji K. New strategies to generate pluripotent stem cells. Current Opinion in Biotechnology 2009 ; 20 : 516-521

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature. 2001 ; 410 : 701-705

Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, Cowan CA, Chien KR, Melton DA. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. Nat Biotechnol. 2008 ; 26 : 313-315

Papapetrou EP, Tomishima MJ, Chambers SM, Mica Y, Reed E, Menon J, et al. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. Proc Natl Acad Sci USA. 2009 ; 106 : 12759-12764

Peiffer I, Barbet R, Hatzfeld A, Li ML and Hatzfeld JA. Optimization of physiological xenofree molecularly defined media and matrices to maintain human embryonic stem cell pluripotency. Methods Mol Biol 2010 ; 584 : 97-108

Poisson J-F, Gosselin P. Recherche sur l'embryon : vers un changement de régime. Article du 22 mars 2013, Le Figaro.

Reppel Loïc. L'utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire : nouvelle approche thérapeutique ? Application à l'ingénierie du cartilage Thèse 2011. 182 p.

Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, and Bongso, A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2002 ; 20 : 933-936

Roncalli J, Lemarchand P. Improving myocardial viability: clinical implications for the use of bone marrow-derived stem cell infusion after acute myocardial infarction. *Interventional Cardiology* 2011 ; 3 : 115-117

Rodolfa KT, Eggan E. A transcriptional logic for nuclear reprogramming. *Cell* 2006 ; 126 : 652-655.

Rossant J. Stem cells and early lineage development. *Cell* 2008 ; 132 : 527-31

Sawadogo D. Traitement du cancer par thérapie cellulaire : cellules souches embryonnaires versus cellules souches adultes. Quels sont les aspects éthiques ? *J. Afr. Cancer* 2010 ; 2 : 1-3

Schulz C.T, Y Young H, D Agulnick A, Babin M.J, E Baetge E, G Bang A, Bhoumik A, Cepa I, M Cesario R, Haakmeester C, Kadoya K, R Kelly J, Kerr J, A Martinson L, B McLean A, A Moorman M, K Payne J, Richardson M, G Ross K, S Sherrer E, Song X, Z Wilson A, P Brandon E, E Green C, J Kroon E, G Kelly O, A d'Amour K, J Robins A. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One* 2012

Schwartz S, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, K Pan C, Ostrick R, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. 2012 ; *The Lancet* 379 : 713-720

Shamblott MJ, Axelman J, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95: 13726-13731.

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, and Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988 ; 336, 688-690.

Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 2009 ; 136 : 964-977

Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic b cells into induced pluripotent stem cells. *Curr. Biol* 2008 ; 18 : 890-894.

Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008 ; 322 : 945-949

Sui L, Liu G-H, Carlos Izpisua Belmonte J. hESC-derived pancreatic progenitors. *Cell Research* 2013 ; 23 : 592-594

Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. 2013 ; 153 : 1228-1238.

Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol CB* 2001 ; 11 : 1553-1558.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 ; 126 : 663-676.

Takahashi M, D. Palmer T, Takahashi J, H. Gage F. Widespread Integration and Survival of Adult-Derived Neural Progenitor Cells in the Developing Optic Retina. *Mol. cell. neuroscience* 1998 ; 12 : 340-348

Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007 ; 448 : 196-9.

Thompson JA, Itskovits-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 ; 282 : 1145-1157.

Thuan NV, Kishigami S, Wakayama T. How to improve the success rate of mouse cloning technology. *J. Reprod. Dev* 2010 ; 56 : 20–30

Tomesco A, Leschik J, Bellamy V, Dubois G, Messas E, Bruneval P, Desnos M, A.Hagège A, Amit M, Itskovitz J, Menasché P, Pucéat M. Differentiation in vivo of cardiac committed human embryonic stem cells in postmyocardial infarcted rats. *Stem Cells* 2007 ; 25 : 2200-2205

Touboul T, Vallier L, Weber A. Cellules souches embryonnaires humaines et iPS ; une source fiable d'hépatocytes fœtaux. *Médecine/Sciences* 2010 ; 26 : 1061-1066

Turner M, Leslie S, Martin G.N, Peschanski M, Rao M, Taylor J.C, Trounson A, Turner D, Yamanaka S, Wilmut I. Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library. *Cell Stem Cell* 2013 ; 13 : 382-384

Warren L, Manos P.D, Ahfeldt T. et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA, *Cell Stem Cell* 2010 ; vol. 7, no. 5 : 618–630

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810–813

Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, et al. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009 ; 458 : 766-770.

Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell* 2009 ; 137 : 13-17.

Yamanaka S et Blau H. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010. 465 ; 704-712

Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells : past, present, and future. *Cell Stem Cell* 2012 ; 10 : 678-684

Young MA, Larson D.E, Sun C.W, George DR, Ding L, Miller C.A, Lin L, Pawlik KM, Chen K, Fan X, et al. Background mutations in parental cells account for most of the genetic

heterogeneity of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2012, *Cell Stem Cell*. 2012 ; 10 : 570-582

Zhang Z, Gao Y, Gordon A, Wang ZZ, Qian Z, Wu W-S. Efficient generation of fully reprogrammed human iPS cells via polycistronic retroviral vector and a new cocktail of chemical compounds. *PloS One* 2011 ; 6 : 26592

Zhang H, Ma Y, Gu J, Liao B, Li J, Wong J, et al. Reprogramming of somatic cells via TAT-mediated protein transduction of recombinant factors. *Biomaterials* 2012 ; 33 : 5047-5055

Zhao X, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009 ; 461 : 86-90

Zhao T, Zhang Z-N, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011 ; 474 : 212–215

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009 ; 4 : 381-384

ANNEXES

Code de la santé publique

- Partie législative
 - Deuxième partie : Santé reproductive, droits de la femme et protection de la santé de l'enfant
 - Livre Ier : Protection et promotion de la santé maternelle et infantile
 - Titre V : Recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires

Chapitre unique.

Article L2151-1

Modifié par [Loi n°2004-800 du 6 août 2004 - art. 25 JORF 7 août 2004](#)

Comme il est dit au troisième alinéa de l'article 16-4 du code civil ci-après reproduit :
Art. [16-4](#) (troisième alinéa).-Est interdite toute intervention ayant pour but de faire naître un enfant génétiquement identique à une autre personne vivante ou décédée.

Article L2151-2

Modifié par [LOI n°2011-814 du 7 juillet 2011 - art. 40](#)

La conception in vitro d'embryon ou la constitution par clonage d'embryon humain à des fins de recherche est interdite.

La création d'embryons transgéniques ou chimériques est interdite.

Article L2151-3

Créé par [Loi n°2004-800 du 6 août 2004 - art. 25 JORF 7 août 2004](#)

Un embryon humain ne peut être ni conçu, ni constitué par clonage, ni utilisé, à des fins commerciales ou industrielles.

Article L2151-4

Créé par [Loi n°2004-800 du 6 août 2004 - art. 25 JORF 7 août 2004](#)

Est également interdite toute constitution par clonage d'un embryon humain à des fins thérapeutiques.

Article L2151-5

Modifié par [LOI n°2013-715 du 6 août 2013 - art. unique.](#)

I.-Aucune recherche sur l'embryon humain ni sur les cellules souches embryonnaires ne peut être entreprise sans autorisation. Un protocole de recherche conduit sur un embryon humain ou sur des cellules souches embryonnaires issues d'un embryon humain ne peut être autorisé que si :

1° La pertinence scientifique de la recherche est établie ;

2° La recherche, fondamentale ou appliquée, s'inscrit dans une finalité médicale ;

3° En l'état des connaissances scientifiques, cette recherche ne peut être menée sans recourir à ces embryons ou ces cellules souches embryonnaires ;

4° Le projet et les conditions de mise en œuvre du protocole respectent les principes éthiques relatifs à la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires.

II.-Une recherche ne peut être menée qu'à partir d'embryons conçus in vitro dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation et qui ne font plus l'objet d'un projet parental. La recherche ne peut être effectuée qu'avec le consentement écrit préalable du couple dont les embryons sont issus, ou du membre survivant de ce couple, par ailleurs dûment informés des possibilités d'accueil des embryons par un autre couple ou d'arrêt de leur conservation. A l'exception des situations mentionnées au dernier alinéa de l'article L. 2131-4 et au troisième alinéa de l'article L. 2141-3, le consentement doit être confirmé à l'issue d'un délai de réflexion de trois mois. Le consentement des deux membres du couple ou du membre survivant du couple est révocable sans motif tant que les recherches n'ont pas débuté.

III.-Les protocoles de recherche sont autorisés par l'Agence de la biomédecine après vérification que les conditions posées au I du présent article sont satisfaites. La décision de l'agence, assortie de l'avis du conseil d'orientation, est communiquée aux ministres chargés de la santé et de la recherche qui peuvent, dans un délai d'un mois et conjointement, demander un nouvel examen du dossier ayant servi de fondement à la décision :

1° En cas de doute sur le respect des principes éthiques ou sur la pertinence scientifique d'un protocole autorisé. L'agence procède à ce nouvel examen dans un délai de trente jours. En cas de confirmation de la décision, la validation du protocole est réputée acquise ;

2° Dans l'intérêt de la santé publique ou de la recherche scientifique, lorsque le protocole a été refusé. L'agence procède à ce nouvel examen dans un délai de trente jours. En cas de confirmation de la décision, le refus du protocole est réputé acquis.

En cas de violation des prescriptions législatives et réglementaires ou de celles fixées par l'autorisation, l'agence suspend l'autorisation de la recherche ou la retire. L'agence diligente des inspections comprenant un ou des experts n'ayant aucun lien avec l'équipe de recherche, dans les conditions fixées à l'article L. 1418-2.

IV.-Les embryons sur lesquels une recherche a été conduite ne peuvent être transférés à des fins de gestation.

Article L2151-6

Modifié par [LOI n°2011-814 du 7 juillet 2011 - art. 43](#)

L'importation de cellules souches embryonnaires aux fins de recherche est soumise à l'autorisation préalable de l'Agence de la biomédecine. Cette autorisation ne peut être accordée que si ces cellules souches ont été obtenues dans le respect des principes fondamentaux prévus par les articles 16 à 16-8 du code civil.

L'exportation de cellules souches embryonnaires aux fins de recherche est soumise aux mêmes conditions que l'importation définie au précédent alinéa.

Article L2151-7

Modifié par [LOI n°2011-2012 du 29 décembre 2011 - art. 5](#)

Modifié par [LOI n°2012-387 du 22 mars 2012 - art. 122](#)

Tout organisme qui assure, à des fins de recherche, la conservation d'embryons ou de cellules souches embryonnaires doit être titulaire d'une autorisation délivrée par l'Agence de la biomédecine.

La délivrance de l'autorisation est subordonnée au respect des dispositions du titre Ier du livre II de la première partie du présent code, des règles en vigueur en matière de sécurité des personnes exerçant une activité professionnelle sur le site et des dispositions applicables en matière de protection de l'environnement, ainsi qu'au respect des règles de sécurité sanitaire.

En cas de non-respect des dispositions mentionnées au deuxième alinéa, l'Agence de la biomédecine peut, à tout moment, suspendre ou retirer l'autorisation.

L'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé est informée des activités de conservation d'embryons ou de cellules souches embryonnaires à des fins de recherche réalisées sur le même site que des activités autorisées par elle en application de l'article L. 1243-2.

Les organismes mentionnés au premier alinéa ne peuvent céder des embryons ou des cellules souches embryonnaires qu'à un organisme titulaire d'une autorisation délivrée en application du présent article ou de l'article L. 2151-5. L'Agence de la biomédecine est informée préalablement de toute cession.

NOTA :

Loi n° 2011-2012 du 29 décembre 2011 article 41 III : Les présentes dispositions entrent en vigueur à une date prévue par le décret pris pour leur application et au plus tard le 1er août 2012. Dès cette entrée en vigueur, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé exerce l'ensemble des droits et supporte l'ensemble des obligations de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Jusqu'à l'entrée en vigueur mentionnée au premier alinéa du présent III, les compétences et pouvoirs que la présente loi attribue à l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé sont exercés par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.

Le décret n° 2012-597 du 27 avril 2012 est entré en vigueur le 1er mai 2012.

Article L2151-7-1

Créé par [LOI n°2011-814 du 7 juillet 2011 - art. 53](#)

Aucun chercheur, aucun ingénieur, technicien ou auxiliaire de recherche quel qu'il soit, aucun médecin ou auxiliaire médical n'est tenu de participer à quelque titre que ce soit aux recherches sur des embryons humains ou sur des cellules souches embryonnaires autorisées en application de l'article L. 2151-5.

Article L2151-8

Modifié par [LOI n°2011-814 du 7 juillet 2011 - art. 43](#)

Les modalités d'application du présent chapitre sont fixées par décret en Conseil d'Etat, notamment les conditions d'autorisation et de mise en œuvre des recherches menées sur des embryons et sur des cellules souches embryonnaires.

Protocoles de recherche sur l'embryon et les cellules embryonnaires autorisés
(classés par ordre alphabétique de titulaire de l'autorisation)

EQUIPES DE RECHERCHE	DATE de l'autorisation	PROTOCOLE DE RECHERCHE
Daniel ABERDAM INSERM UMR 898 - Nice	11/07/2005 17/09/2010	Utilisation des CSEH pour la production de lignées épidermiques et limbiques à potentiel thérapeutique des pathologies cutanées de la cornée. <i>Autorisation d'importation le 11 juillet 2005 (JO 23/07)</i> <i>Autorisation de conservation le 20 septembre 2006 (JO 16/11)</i> <i>Renouvellement des autorisations (recherche et conservation) le 17 septembre 2010.</i> Rapport final remis le 23/03/2012 Décisions de mettre fin aux autorisations de recherche et de conservation le 18/07/2012
Abdel AOUACHERIA Jean-François GUERIN CNRS UMR 5086 - IBCP Lyon CHU Lyon - Bron	22/12/2008	Etude de la protéine de survie BCL2L10, un membre divergent de la famille BCL2, lors du développement embryonnaire précoce chez l'humain (embryon). Rapport final remis le 04/03/2010
Anne-Lise BENNACEUR Ali TURHAN INSERM UMR 935 Hôpital Paul Brousse - Villejuif	19/06/2006	1. Identification de CSH et de progéniteurs lymphoïdes à partir de la différenciation des CSEH 2. Caractérisation de la différenciation endothéliale à partir des CSEH. <i>Autorisations d'importation et de conservation le 19 juin 2006 (JO 4/08)</i> <i>Autorisation d'importation le 11 juillet 2007 (JO 29/08)</i> <i>Modification de l'autorisation le 11 juillet 2007 (JO 29/08) : Reprise de la direction des recherches par Anne-Lise Bennaceur</i>
	09/02/2007	Caractérisation du potentiel hémangioblastique / hématopoïétique des CSEH à visée thérapeutique et établissement de modèle d'études de CS leucémiques. <i>Autorisation d'importation le 9 février 2007 (JO 22/03) et le 17/12/2010 (JO 16/02)</i>
	21/01/2011	<i>Renouvellement des autorisations délivrées le 19 juin 2006 et le 9 février 2007 (regroupement des deux protocoles de recherche) le 21 janvier 2011 (JO 18/03).</i> <i>Renouvellement de l'autorisation de conservation le 21 janvier 2011 (JO 18/03).</i>
Anne-Lise BENNACEUR Nelly FRYDMANN Jean-Yves PICARD INSERM UMR 935 Hôpital Paul Brousse - Villejuif INSERM UMR 782 Hôpital Antoine Béclère - Clamart	28/01/2008	Différenciation des cellules germinales - Mise en place de l'information épigénétique (embryon-CSEH). Fin de la recherche
Anne-Lise BENNACEUR Gérard TACHDJIAN INSERM UMR 935 Hôpital Paul Brousse - Villejuif	20/09/2006	Etablissement de modèles d'études physiopathologiques des hémopathies malignes liées à des déséquilibres et instabilités génétiques constitutionnelles (embryon). <i>Autorisation d'importation le 20 septembre 2006 (JO 16/11)</i> Fin de la recherche
	20/06/2008	Dérivation et caractérisation de lignées de CSEH porteuses de mutation à l'origine de maladies monogéniques à visée de recherche (embryon) Fin de la recherche
Jean-Paul BONNEFONT INSERM UMR 781 Hôpital Necker - Paris	20/09/2006	Etude de l'impact des mutations de l'ADNmt sur la ségrégation de l'ADNmt et sur l'expression des gènes mitochondriaux chez les embryons humains atteints de mitochondriopathies (embryon). Fin de la recherche
CLEAN CELLS Marc MEICHENIN Bouffère	25/05/2012	Thérapie cellulaire de l'épiderme à partir de kératinocytes dérivés de CSEH.
Cristelle CORAUX INSERM UMR 903 - Reims	08/07/2005 17/09/2010	Etude des potentialités des cellules épithéliales respiratoires issues de CSEH dans le traitement de la mucoviscidose. <i>Autorisation d'importation le 8 juillet 2005 (JO 21/07)</i> <i>Autorisation de conservation délivrée au CHU de Reims le 8 juillet 2005 (JO 21/07)</i> <i>Modification de l'autorisation le 13/4/2007* : reprise de la direction des recherches de E. PUCHELLE par C. CORAUX</i> <i>Renouvellement de l'autorisation le 17 septembre 2010.</i>

EQUIPES DE RECHERCHE	DATE de l'autorisation	PROTOCOLE DE RECHERCHE
	24/10/2005	Etude des potentialités des cellules épithéliales respiratoires produites à partir de CSEH porteuses de la mutation caractérisant la mucoviscidose dans le traitement de cette maladie. <i>Autorisation d'importation le 24 octobre 2005 (JO 16/11)</i> <i>Modification de l'autorisation le 13/4/2007* : reprise de la direction des recherches de E. PUCHELLE par C. CORAUX</i> Fin de la recherche
Anne CORLU INSERM UMR 991 CHU Rennes - Rennes	25/06/2010	Différenciation de progéniteurs hépatiques dérivés de CSEH en hépatocytes matures. <i>Autorisation d'importation et de conservation le 25 juin 2010.</i>
Laurent DAVID CHU Nantes (structure fédérative François Bonamy, plateforme iPS) Nantes	11 juillet 2013	Etude de la caractérisation de la pluripotence chez les cellules souches pluripotentes humaines <i>Autorisation d'importation et de conservation le 11 juillet 2013 (JO 10/10)</i>
	24 avril 2014	Etude des déterminants de la pluripotence lors du développement humain pré-gastrulation (JO 19/06)
Martine DAUJAT-CHAVANIEU Patrick MAUREL INSERM UMR 632 - Montpellier	24/10/2005 17/12/2010	Etude de la différenciation des CSEH en hépatocytes. <i>Autorisation d'importation le 28 février 2007 (JO 11/04)</i> <i>Renouvellement de l'autorisation de recherche le 17 décembre 2010 (JO 16/02)</i>
Gilles DUVERLIE Université de Picardie Jules Verne Amiens	11 juillet 2013	Différenciation de la lignée de CSEH H9 pour l'étude de la permissivité des hépatites humaines. <i>Autorisation de conservation le 11 juillet 2013 (JO 10/10)</i>
John DE VOS CHU Montpellier	08/07/2005 17/09/2010	Etude des modifications du transcriptome des CSEH au cours de leur différenciation précoce en précurseurs cardiomyocytaires, précurseurs neuronaux et précurseurs hépatopancréatiques. <i>Autorisations d'importation et de conservation le 8 juillet 2005 (JO 21/07)</i> <i>Autorisation d'importation le 13 avril 2007 (JO 15/06)</i> <i>Renouvellement des autorisations de recherche et de conservation le 17 septembre 2010.</i>
	13/07/2006	Dérivation de nouvelles lignées de CSEH et étude des déterminants de leur pluripotence (embryon). Fin de la recherche
	03/03/2014	Etude des anomalies génétiques des cellules souches embryonnaires humaines (inventaire, marqueurs et facteurs favorisants) (JO 06/05).
Luc DOUAY UPRES EA 1638 Université P. et M. Curie - Paris	10/01/2006 17/12/2010	Maîtrise de la différenciation des CSEH en cellules souches hémangioblastiques et étude de leurs potentialités thérapeutiques dans le cadre de greffes et à des fins transfusionnelles. <i>Autorisation d'importation le 10 janvier 2006 (JO 24/01)</i> <i>Autorisation de conservation délivrée à l'EFS Ile de France le 10 janvier 2006 (JO 24/01)</i> <i>Renouvellement des autorisations (recherche et conservation) le 17 décembre 2010 (JO 16/02)</i> <i>Autorisation d'importation le 11 juillet 2013 (JO 10/10)</i>
Brigitte DRENO CHU Nantes	17/12/2010 11/02/2013	Etude de la thérapie cellulaire de l'épiderme à partir de kératinocytes dérivés de CSEH. <i>Autorisation d'importation et de conservation le 17 décembre 2010 (JO 16/02).</i> <i>Renouvellement des autorisations de recherche et de conservation le 11/02/2013 (JO19/03)</i>
Sylvie GARCIA Institut Pasteur - Paris	19/06/2006 12/03/2010	Etablissement de modèles animaux chimériques Hommes/souris : application à l'étude de l'infection par le VIH. <i>Autorisations d'importation et de conservation le 19 juin 2006 (JO 04/08)</i> <i>Renouvellement des autorisations (recherche et conservation) le 12 mars 2010 (JO 11/5)</i>
GENETHON BIOPROD Christophe COCHET Evry	03/03/2014	Production du substitute épidermique PACE par un établissement pharmaceutique en vue d'un essai Clinique de phase I/II <i>Autorisation de conservation le 27 mars 2014 (JO 12/05).</i>

EQUIPES DE RECHERCHE	DATE de l'autorisation	PROTOCOLE DE RECHERCHE
Romain GHERARDI INSERM UMR 955 - Créteil	03/07/2006	Différenciation standardisée in vitro des CSEH en cellules myogéniques et validation in vivo de leur potentiel thérapeutique. <i>Autorisation d'importation le 3 juillet 2006 (JO 23/08)</i> Rapport final remis le 04/03/2010
Pierre GRESSENS INSERM UMR 676 Hôpital Robert Debré Paris	22/12/2008	Différenciation neurale de CSEH et approches de thérapie cellulaire de modèles murins de lésions cérébrales. <i>Autorisations d'importation et de conservation le 22 décembre 2008 (JO 6/03)</i> <i>Renouvellement des autorisations (recherche et conservation) le 03 mars 2014 (JO 06/05).</i>
Samir HAMAMAH Frank PELLESTOR CHU Montpellier	11/07/2007 15/07/2012	Identification des biomarqueurs moléculaires, impliqués dans la régulation des embryons préimplantatoires humains : approche transcriptomique (embryon). <i>Renouvellement de l'autorisation le 15 juillet 2012 (JO 05/10)</i>
Julie KERR-CONTE Inserm U859 - Lille	11 juillet 2013	Développement de la technologie permettant d'établir des cellules souches humaines pluripotentes induites destinées à des recherches sur la modélisation du diabète de type 2. <i>Autorisation d'importation et de conservation le 11 juillet 2013 (JO 10/10)</i>
Jérôme LARGHERO CNRS FRE 2593 Hôpital Saint Louis - Paris	13/07/2006 17/12/2010	Spécification cardiaque des CSEH : vers une thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque <i>Autorisation de conservation le 13 juillet 2006 (JO 26/08)</i> <i>Renouvellement des autorisations (recherche et conservation) le 17 décembre 2010 (JO 16/02)</i>
	17/02/2012	Etude du développement d'un produit de thérapie cellulaire (RPE, Epithélium pigmentaire rétinien) dérivé des cellules souches embryonnaires humaines.
Marie-Caroline LE BOUSSE – KERDILES INSERM UMR 972 Hôpital Paul Brousse - Villejuif	17/12/2010	Rôle du couple SDF-1 α / TGF- β dans le contrôle du cycle cellulaire des CSEH. <i>Renouvellement de l'autorisation le 25 mai 2012 (JO 19/08)</i>
Annick LEFEBVRE Jean-François GUERIN INSERM UMR 846 - Bron	20/6/2008	Caractéristiques épigénétiques de l'embryon humain préimplantatoire : analyse du profil de méthylation de gènes soumis à empreinte parentale (embryon). <i>Modification de l'autorisation le 20/11/2009 : Reprogrammation épigénétique dans l'embryon humain préimplantatoire : analyse du profil de méthylation de Nanog et Oct 4 (embryon)</i> Rapport final remis le 18 novembre 2011.
Sylvain LEHMANN CNRS UPR 1142 - Montpellier	08/07/2005 23/04/2010	A travers une approche protéomique des CSEH, étude des mécanismes d'autorenouvellement et de différenciation de ces cellules. <i>Autorisations d'importation et de conservation le 8 juillet 2005 (JO 23/07)</i> <i>Renouvellement des autorisations (recherche et conservation) le 23 avril 2010 (JO 2/6)</i>
Jean-Marc LEMAITRE INSERM UMR 661 - Montpellier	15/06/2007 18/07/2012	Etude de la reprogrammation des cellules sénescents vers la pluripotence. <i>Renouvellement de l'autorisation de recherche le 18/07/2012 (JO 05/10)</i> <i>Autorisation de conservation des CSEH à des fins de recherche le 18/07/2012 (JO 05/10)</i>
MABGENE - Alès Patrick HENNO	13/07/2006	Maîtrise de la différenciation des CSEH en cardiomyocytes et étude de leur potentialité dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. <i>Autorisation de conservation le 13 juillet 2006 (JO 26/08)</i> <i>Autorisation d'importation le 20 juin 2008 (JO 06/08)</i> Rapport final remis le 26 mai 2011.
Marcel MECHALI CNRS UPR 1142 - Montpellier	15/06/2007	Signatures des origines de réplication et compétence à la réplication des CSEH en autorenouvellement ou induites en différenciation. <i>Renouvellement de l'autorisation (recherche) le 25 mai 2012 (JO 19/08) et de conservation le 23 novembre (JO17/01)</i>
Brigitte ONTENIENTE INSERM UMR 861 Evry	19/06/2006 12/03/2010	Potentiel thérapeutique des CSEH dans les lésions aiguës du système nerveux. <i>Autorisation de conservation le 13 juillet 2006 (JO 26/08)</i> <i>Modification des autorisations le 15/6/2007 : changement de locaux</i> <i>Autorisation d'importation le 27 octobre 2008 (JO 31/10)</i> <i>Renouvellement de l'autorisation de recherche le 12 mars 2010 (JO 11/05)</i> Rapport final le 26/03/2012. Décision de mettre fin à l'autorisation de recherche le 18/04/2012.

EQUIPES DE RECHERCHE	DATE de l'autorisation	PROTOCOLE DE RECHERCHE
Catherine PATRAT AP-HP Paris	11/07/2007 21/01/2011	Etude de la dynamique des changements épigénétiques au cours du développement préimplantatoire de l'embryon humain en utilisant l'inactivation du chromosome X comme processus modèle (embryon). <i>Renouvellement de l'autorisation le 21 janvier 2011 (JO 18/03).</i> <i>Modification substantielle de l'autorisation le 11/02/2013 : collaboration d'une nouvelle équipe (JO19/03)</i>
Marc PESCHANSKI Sandrine BAGHDOYAN INSERM UMR 861 Laboratoire I-stem - Evry	19/08/2005 25/06/2010	Etude des mécanismes impliqués dans la dystrophie myotonique de type 1 (ou maladie de Steinert) et l'identification de composés permettant un intérêt thérapeutique potentiel pour cette maladie. <i>Autorisation d'importation le 19 août 2005 (JO 30/08)</i> <i>Modification substantielle de l'autorisation le 11/7/2007** : déménagement du laboratoire</i> <i>Autorisation d'importation le 25 février 2008 (JO 20/04), le 20 juin 2008 (JO 6/08)</i> <i>Renouvellement de l'autorisation le 25 juin 2010 (JO 4/08).</i>
	20/06/2008	Modélisation de la dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale (FSH) par l'utilisation de CSEH porteuses de la mutation. <i>Autorisation d'importation le 20 juin 2008 (JO 6/08)</i> Fin de la recherche
Marc PESCHANSKI Christine BALDESCHI INSERM UMR 861 Laboratoire I-stem - Evry	19/08/2005	Modélisation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de la génodermatose de Clouston aux fins d'études physiopathologiques et thérapeutiques. <i>Autorisation d'importation le 10 janvier 2008 (JO 29/02)***</i> <i>Modification substantielle de l'autorisation le 11/7/2007** : déménagement du laboratoire</i> Rapport final remis le 30/03/2010
	25/06/2010	Modélisation <i>in vivo</i> des défauts de pigmentation impliqués dans la neurofibromatose de type 1 à des fins d'études physiopathologiques et thérapeutiques.
Marc PESCHANSKI Alexandra BENCHOUA CECS – Laboratoire I-stem - Evry	24/09/2012	Comprendre et corriger les défauts du développement précoce du système nerveux associés aux troubles du spectre autistique en utilisant la progénie neurale dérivée de cellules souches embryonnaires humaines. <i>Autorisation d'importation le 24 septembre 2012 (JO06/12)</i>
Marc PESCHANSKI Delphine LAUSTRIAT INSERM UMR 861 CECS – Laboratoire I-stem - Evry	17/02/2012	Les CSEH pour l'exploration des mécanismes de toxicité chronique aiguë : application aux lignages musculaires et kératinocytaires.
Marc PESCHANSKI Yacine LAABI INSERM UMR 861 CECS – Laboratoire I-stem - Evry	18/07/2012	Conservation des cellules souches embryonnaires humaines à des fins de recherche.
Marc PESCHANSKI Gilles LEMAITRE INSERM UMR 861 CECS – Laboratoire I-stem - Evry	17/12/2010 11/02/2013	Etude de la thérapie cellulaire de l'épiderme à partir de kératinocytes dérivés de CSEH. <i>Autorisation d'importation le 17 décembre 2010 (JO 16/02).</i> <i>Renouvellement de l'autorisation de recherche le 11/02/2013 (JO19/03)</i>
	13/09/2005	Validation des méthodes d'obtention de cardiomyocytes à partir de CSEH et étude de leur potentiel thérapeutique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque liée à la myopathie de Duchenne. <i>Modification de l'autorisation le 11/7/2007** : déménagement du laboratoire</i> Rapport final remis le 8 juillet 2010.
Marc PESCHANSKI Christelle MONVILLE INSERM UMR 861 Laboratoire I-stem - Evry	22/12/2008	Modélisation de l'ataxie spinocérébelleuse de type 7 par l'utilisation de CSEH porteuses de la mutation. Rapport final remis le 6 avril 2011.
	21/01/2011	Etude de la dérivation de CSEH en photorécepteurs : applications thérapeutiques pour les pathologies rétiniennes.
	11/02/2013	Etude des rôles physiopathologiques de la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli) à l'aide de cellules souches embryonnaires humaines (JO 19/03).

EQUIPES DE RECHERCHE	DATE de l'autorisation	PROTOCOLE DE RECHERCHE
Marc PESCHANSKI Anselme PERRIER INSERM UMR 861 Laboratoire I-stem - Evry	16/02/2005 12/03/2010	Etude des potentialités de cellules neuronales obtenues à partir de CSEH dans le traitement de la maladie de Huntington. <i>Autorisation d'importation le 16 février 2005 (JO 03/03), le 10 janvier 2008 (JO 29/02) et le 12 mars 2010 (JO 11/05)</i> <i>Autorisation de conservation délivrée au GENETHON le 16 février 2005 (JO 03/03)</i> <i>Modification de l'autorisation le 11/7/2007** : déménagement du laboratoire</i> <i>Renouvellement de l'autorisation le 12 mars 2010 (JO 11/05)</i>
	10/01/2006 21/01/2011	Etude des mécanismes physiopathologiques de la maladie de Huntington et identification de composés présentant un intérêt thérapeutique potentiel pour cette maladie. <i>Autorisation d'importation le 10 janvier 2006 (JO 24/01)</i> <i>Modification de l'autorisation le 11/7/2007** : déménagement du laboratoire</i> <i>Autorisations d'importation le 10 janvier 2008 (JO 29/02)***, le 25 février 2008 (JO 09/04), le 26 mai 2008 (JO 18/07)</i> <i>Renouvellement de l'autorisation le 21 janvier 2011 (JO 18/03).</i>
	10/07/2009	Recherche par criblage à haut débit de molécules chimiques activatrices de la neurogenèse endogène pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.
Marc PESCHANSKI Christian PINSET INSERM UMR 861 CECS – Laboratoire I-stem - Evry	28/05/2010	Etude des cellules musculaires précurseurs dérivées de CSEH pour définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les pathologies musculaires génétiques et acquises.
Olivier POURQUIE Marie KNOCKAERT INSERM UMR 964 IGMBBC - Illkirch	18/12/2009	Différenciation des CSEH en muscle squelettique pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. <i>Autorisations d'importation et de conservation le 18 décembre 2009 (JO 27/01)</i>
Michel PUCEAT INSERM UMR 861 Campus Genopole - Evry	08/07/2005 17/09/2010	Mécanismes génétiques de la spécification cardiaque des CSEH : une recherche prospective de traitements des pathologies ischémiques et génétiques cardiaques. <i>Autorisation d'importation le 8 juillet 2005 (JO 21/07) et le 9 février 2007 (JO 22/03)</i> <i>Modification de l'autorisation le 09/02/2007 : transfert des recherches vers une autre unité INSERM</i> <i>Modification de l'autorisation le 11/07/2007 : déménagement du laboratoire</i> <i>Modification de l'autorisation le 20/03/2009 : déménagement du laboratoire</i> <i>Renouvellement de l'autorisation de recherche le 17 septembre 2010.</i> <i>Autorisation de conservation le 17 septembre 2010.</i>
Claire ROUGEULLE Anne-Lise BENNACEUR CNRS UMR Université Diderot - Paris INSERM UMR 935 Hôpital Paul Brousse - Villejuif	22/12/2008 16/01/2012	Contrôle et stabilité des régulations épigénétiques dans les CSEH : étude de l'inactivation du chromosome X. <i>Autorisation d'importation le 22 décembre 2008 (JO 02/03)</i> <i>Autorisation d'importation et de conservation le 16 janvier 2012.</i> <i>Renouvellement de l'autorisation de recherche le 16/01/2012.</i>
Pierre SAVATIER INSERM UMR 846 - Bron	22/03/2005 12/03/2010	Identification des gènes impliqués dans le contrôle de l'autorenouvellement des CSEH et différenciation des CSEH en neurones dopaminergiques. <i>Autorisations d'importation et de conservation le 22 mars 2005 (JO 08/04)</i> <i>Renouvellement des autorisations (recherche et conservation) le 12 mars 2010 (JO 11/05)</i> <i>Renouvellement des autorisations (recherche et conservation) le 19 juin 2013 (JO 27/08)</i>
	13/04/2007	Dérivation et caractérisation de lignées de CSEH (embryon). Rapport final le 04/08/2010.
	10/01/2008 24/01/2011	Criblage fonctionnel d'aptamères peptidiques stimulant l'autorenouvellement des CSEH. <i>Autorisation d'importation le 12 mars 2010.</i> <i>Renouvellement de l'autorisation le 24 janvier 2011.</i>
Eric SOLARY William VAINCHENKER INSERM U1009 Institut G. Roussy - Villejuif	21/03/2005 12/03/2010 03/03/2014	Etude de la différenciation hématopoïétique avec modélisation in vitro d'hémopathies malignes à partir de cellules souches embryonnaires humaines. <i>Autorisations d'importation et de conservation le 21 mars 2005 (JO 01/04)</i> <i>Autorisation d'importation du 19 juin 2006 (JO 12/08)</i> <i>Modification de l'autorisation le 09/2/2007 : transfert d'une partie des recherches sur le site de l'unité INSERM U602 (Hôp. Paul Brousse, Villejuif)</i> <i>Modification de l'autorisation le 10/01/2008 : restriction du domaine de la recherche (modélisation in vivo d'hémopathies malignes à partir de CSEH)</i> <i>Renouvellement des autorisations (recherche et conservation) le 12 mars 2010 (JO 11/05)</i>

19 juin 2014

EQUIPES DE RECHERCHE	DATE de l'autorisation	PROTOCOLE DE RECHERCHE
		<i>Modification des autorisations (recherche et conservation) le 03 mars 2014 (JO 06/05).</i>
TEXCELL Bernard PLICHON Evry	12/03/2010	Transplantation de CSEH allogéniques dans le traitement de l'insuffisance cardiaque sévère chez l'homme.
Georges UZAN INSERM UMR 972 Hôpital Paul Brousse - Villejuif	17/12/2010	Identification de cellules souches mésodermiques, produites à partir de CSEH, capables de générer des cellules endothéliales et mésenchymateuses fonctionnelles.
Stéphane VIVILLE INSERM UMR 964 IGBMC - Illkirch	25/06/2010	Maintien de la diploïdie dans les CSEH.
Anne WEBER Anne DUBART INSERM UMR 972 - Villejuif	11/07/2005 17/09/2010 18/07/2012	Etude des mécanismes intervenant dans la différenciation des CSEH en hépatoblastes et identification des gènes impliqués dans cette différenciation <i>Autorisations d'importation et de conservation le 11 juillet 2005 (JO 23/07)</i> <i>Renouvellement des autorisations recherche et conservation le 17 septembre 2010.</i> <i>Modification de l'autorisation de recherche le 18/07/2012 : déménagement dans les locaux de l'unité INSERM UMR 972 et désignation d'un co-responsable de la recherche (JO)</i> <i>Autorisation d'importation le 18/07/2012.</i>

* décision unique pour les deux protocoles repris par C. Coraux

** décision unique pour les cinq protocoles impactés par le déménagement du laboratoire I-Stem

*** décision unique pour les quatre protocoles concernés par cette décision d'autorisation d'importation.

AUTEUR : Hélène GREGOIRE

TITRE : COMPARAISON ENTRE DEUX TYPES DE CELLULES SOUCHES
PLURIPOTENTES : EMBRYONNAIRES ET INDUITES.

DIRECTEUR DE THESE : Bettina COUDERC

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Le 3 octobre 2014,
Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Paul Sabatier Toulouse III.

Les récentes découvertes du Pr Yamanaka sur la reprogrammation des cellules différenciées en cellules souches iPSC ouvrirent des perspectives équivalentes à celles des cellules souches embryonnaires (ESC) dans le domaine de la thérapie cellulaire. Pour savoir à quel point les iPSC se rapprochent des ESC, il faut d'abord comprendre les deux caractéristiques d'une cellule souche, auto-renouvellement et différenciation, les différents degrés de potence et comment obtenir de ces cellules qu'elles soient pluripotentes. Les ESC obtenues à partir de l'ICM d'un embryon sont comparées aux iPSC obtenues par transfection de quatre gènes : Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4. Les essais cliniques en cours sont plus nombreux et moins chers pour les ESC, mais les iPSC ont l'avantage du statut immunitaire et de la bioéthique. Ces problèmes éthiques soulèvent en effet la question de la nature de l'embryon ainsi que de la place de l'éthique dans le domaine médical. Les iPSC peuvent-elles remplacer les ESC et est-il pertinent de freiner la recherche sur les seuls motifs éthiques ?

COMPARISON BETWEEN TWO TYPES OF PLURIPOTENT STEM CELL :
EMBRYONIC AND INDUCED.

Pr. Yamanaka's recent discoveries of reprogramming differentiated cells to iPSC cells opened prospects equivalent to those of embryonic stem cells (ESCs) in the field of cell therapy. To know how close iPSCs and ESCs are, one needs to understand each stem cell's characteristics, self-renewal and differentiation, the various levels of pluripotency and how to obtain pluripotency from these cells. ESCs obtained from embryo's ICMs are compared with iPSCs obtained by transfection of four genes : Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4. The ongoing clinical trials with ESCs are more numerous and cheaper, but iPSCs take advantage from immune status and bioethics. These ethical problems raise the issue of the nature of the embryo as well as the place of ethics in the medical field. Could iPSCs replace ESC's and is it relevant to hinder research just because of ethical motives?

MOTS-CLES : cellules souches – pluripotence – embryonnaire – reprogrammation – iPSC –
comparaison – éthique – essais cliniques

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pharmacie