

Les cellules IPS rendent-elles obsolète l'usage des cellules embryonnaires et du clonage, dans la poursuite d'une thérapeutique ?

Deux équipes de chercheurs – l'une japonaise, dirigée par Shinya Yamanaka, de l'Université de Kyoto, et l'autre, américaine, dirigée par James Thomson, de l'université Wisconsin-Madison – ont annoncé avoir réussi à créer des lignées de cellules souches pluripotentes humaines à partir de fibroblastes, cellules constitutives de l'épiderme. Ces travaux ont été publiés respectivement dans les revues scientifiques *Cell* et *Science* de novembre 2007. Les cellules de peau humaine ont été reprogrammées, en y introduisant quatre gènes différents au moyen d'un rétrovirus, pour être transformées en cellules, dites iPS, ayant les mêmes propriétés que les cellules souches embryonnaires ; c'est-à-dire capables de se différencier en plusieurs types de cellules du corps humain. Cette avancée révolutionnaire est l'application à l'homme de la première découverte faite par Yamanaka : en août 2006, il avait, en insérant quatre gènes dans des cellules de peau de souris, obtenu des cellules au potentiel comparable à celles des cellules souches embryonnaires. Cette découverte révolutionnaire est-elle de nature à mettre un terme à la recherche sur l'embryon et le clonage ?

A/ Les iPS présentent les caractéristiques spécifiques aux hESC¹

Les cellules iPS sont des cellules reprogrammées génétiquement qui, étant redevenues pluripotentes, équivalent aux hESC non différenciées.

1/ au niveau morphologique : qualité d'auto-renouvellement et de prolifération, antigènes de surface spécifiques, expression des gènes, statut épigénétique de cellules pluripotentes (chromatine), marqueurs spécifiques.

2/ réaction *in vitro* : elles sont capables de maintenir leur auto-renouvellement et de donner des cellules des 3 feuillets embryonnaires

3/ réaction *in vivo* (réinjectées après leur obtention) identique à celle des hESC : elles forment des tératomes.

→ Réponse à certaines objections

- *Pour le criblage de molécules pharmacologiques, nécessaire à la modélisation d'une pathologie et à la création d'un futur médicament, la communauté scientifique rapporte que les hESC sont le meilleur type de cellules à utiliser car elles prolifèrent particulièrement rapidement.*

Or le temps gagné en criblant avec ces cellules sera perdu dans le temps requis pour trouver un embryon porteur de la maladie à modéliser (le plus souvent issu de Diagnostic Pré-implantatoire (DPI)). Des chercheurs renommés utilisent déjà des fibroblastes de patients reprogrammés en cellules pluripotentes porteuses de l'anomalie recherchée, dont les capacités prolifératives sont équivalentes².

¹ Ces caractéristiques sont décrites dans la publication K. Takahashi, K. Tanabe and al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, 2007, 131 : 861-872 - J. Thomson and al., Induced pluripotent stem cells lines derived from human somatic cells, *Science*, 2007, 318 : 1917-1920.

² I. Park et al., *Cell*, 134, 877, 2008. Etude de Georges Daley, cité dans l'article de La Recherche N°4 26 - 01/2009 - PALMARÈS 2008, "Les promesses des cellules iPS", Sophie Coisne.

B/ Une technique d'obtention des IPS fiable

1/ Risque oncogène ? Le problème du transgène c-Myc qui est oncogène a été résolu quelques semaines seulement après la découverte de 2007 : dorénavant, on utilise un nouveau gène, n-Myc, qui n'est pas cancérigène et élimine donc le risque³.

2/ Risques liés aux vecteurs viraux ? La reprogrammation demandait d'utiliser des vecteurs viraux (virus utilisés pour insérer les gènes reprogrammants). On a reproché à Yamanaka d'utiliser cette méthode de transfert de gène pour obtenir sa reprogrammation, sachant que le vecteur en question, utilisé à l'hôpital Necker contre le SCID-X, avait déclenché des leucémies : une reprogrammation identique a pu être obtenue sans faire appel à un vecteur rétroviral⁴, en utilisant une transduction par plasmide⁵, ou un vecteur "épisomal" dérivé du virus Epstein Barr, qui est éliminé lors de la réplication cellulaire⁶. R.Blelloch et al. ont pu reprogrammer des cellules somatiques en ayant recours à des microRNAs spécifiques des cellules souches embryonnaires⁷.

De plus, on n'injecte pas directement de cellules ainsi obtenues chez le patient mais on crée des lignées cellulaires à partir des cellules iPS qui n'expriment donc plus l'action du vecteur viral.

3/ Résistance aux antibiotiques ? L'utilisation d'un gène résistant aux antibiotiques, qui a permis d'isoler les rares cellules pleinement reprogrammées parmi les millions de cellules non reprogrammées, et qui a permis ensuite de faire se multiplier particulièrement ces cellules, n'est plus nécessaire : on peut dorénavant isoler les cellules iPS sur leurs simples critères morphologiques⁸.

→ Réponse à certaines objections

- *Certains disent que les cellules iPS introduites dans un embryon en développement ne peuvent pas donner de chimères (embryon avec cellules mixtes des 2 provenances), ce qui pourtant prouverait leur capacité d'auto-renouvellement infini.*

Or 3 équipes différentes ont créé des souris chimériques après insertion de cellules iPS dans des embryons qui ont eux-mêmes transmis l'ADN iPS à leurs petits (K. Okitua et al, R. Jaenish, K. Hochedlinger, K. Plath)⁹ : la capacité de division à long terme de ces cellules est donc prouvée.

³ M.Nakagawa, M.Koyanagi, K.Tanabe, K.Takahashi, T.Ichisaka, T.Aoi, K.Okita, Y.Mochiduki, N.Takizawa, S.Yamanaka, *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*, Nature Biotechnology, 30 November 2007

⁴ A.Maeissner, R.Jaenisch, Nat Biotechnol oct 2007

⁵ K.Okita, S.Yamanaka, et al., *Generation of induced pluripotent cells without viral vectors*, Science, 7 nov 2008, vol.322, n°5903, pp.949-953

⁶ J.Yu, J.A.Thomson et al., Science, 8 may 2009, vol.324, pp 797-801

⁷ R.J.Judson et al., Nature Biotechnology, May 2009, vol. 27, n°5, pp.459-461

⁸ A.Meissner, M.Wernig, R.Jaenisch, *Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells*, Nature Biotechnology., October 2007, vol.25, n°10, pp.1177-1181

⁹ K.Okita, T.Ichisaka, S.Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*, Nature, 19 July 2007, vol.448, n°7151, pp.313-317.

M.Wernig, A.Meissner, R.Foreman, T.Brambrink, M.Ku, K.Hochedlinger, B.E.Bernstein, R.Jaenisch, *In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state*, Nature, 19 July 2007, vol.448, n°7151, pp.318-324.

N.Maherali, R.Sridharan, W.Xie, J.Utkal, S.Eminli, K.Arnold, M.Stadtfelt, R.Yachechko, J.Tchieu, R.Jaenisch, K.Plath, K.Hochedlinger, *Directly reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution*, Cell Stem Cell, June 2007, vol.1, n°1, pp.55-70.

- Certains disent que les cellules iPS n'auraient pu être obtenues sans l'utilisation d'embryons humains.

Or au contraire les travaux de S. Yamanaka ont montré que cette étape n'était pas nécessaire. Explication.

- Des chercheurs ont travaillé sur la reprogrammation cellulaire à partir de l'embryon humain **mais l'étude de S. Yamanaka** du 25 août 2006¹⁰ (précédent la découverte qui le rendra célèbre), **porte sur des embryons de souris** (et non humains).

- Yamanaka identifie dans cette publication, plusieurs facteurs potentiellement acteurs dans la reprogrammation. **A sa grande surprise, le facteur *Nanog* identifié auparavant par J. Silva par des études sur l'embryon humain, notamment par clonage, comme un facteur essentiel** et responsable de l'acquisition de la pluripotentialité dans les cellules embryonnaires au stade morula et également de la transformation du noyau de cellules somatiques en cellules pluripotentes quand elles sont transférées dans le cytoplasme d'une cellule embryonnaire – sans ovocyte¹¹, **n'apparaît plus responsable de cette action.** Ce sont 4 autres gènes qui ont ce rôle : *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* et *Klf4* (identifiés parmi 24 gènes choisis par Yamanaka au début, en procédant par élimination). *Nanog*, identifié grâce à des études sur l'embryon humain, notamment par clonage, n'était donc pas responsable de la reprogrammation¹². Ces études n'étaient donc pas requises pour reprogrammer des cellules somatiques.

- **Yamanaka a 1 an d'avance** concernant l'identification des gènes reprogrammants, par rapport à la publication de J. Thomson du 20 novembre 2007, car ce dernier, contrairement à Yamanaka, a effectué ses recherches à partir d'hESC. Une autre distinction entre leurs travaux respectifs est que: J. Thomson a reprogrammé des cellules de peau de fœtus et de nouveau-nés¹³, alors que Yamanaka a directement prouvé l'efficacité de sa technique de reprogrammation à partir de fibroblastes de personnes adultes¹⁴.

Ian Wilmut, *Président du Conseil de recherche médicale en biologie reproductive du Centre de médecine régénérative à l'université d'Edimbourg (Ecosse), Ian Wilmut et le premier à avoir cloné avec succès un mammifère - la brebis Dolly*, confirme que les iPS n'ont pas été obtenues par les cellules embryonnaires :

→: « *La dé-différenciation de cellules somatiques n'a pas requis l'utilisation d'embryon humain car, au niveau technique, cela n'était pas nécessaire. Les premières cellules iPS ont été produites et identifiées à partir d'études sur des embryons de souris* ».

- Certains disent que les recherches sur la reprogrammation requièrent l'utilisation d'embryons humains.

Or de nombreuses études ont été menées sans utiliser l'embryon humain, mais des cellules embryonnaires ou adultes d'animaux. Exemples sur la reprogrammation cellulaire :

¹⁰ K.Takahashi, S.Yamanaka, *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblasts Cultures by Defined Factors*, Cell, 25 August 2006, vol.126, n°4, pp.663-676.

¹¹ J.Silva, I.Chambers, S.Pollard, A.Smith, *Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion*, Nature, 22 June 2006, vol.441, n°7096, pp.997-1001.

¹² K.Takahashi, S.Yamanaka, *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblasts Cultures by Defined Factors*, Cell, 25 August 2006, vol.126, n°4, pp.663-676.

¹³ J. Thomson and al., *Induced pluripotent stem cells lines derived from human somatic cells*, Science, 2007, 318 : 1917-1920.

¹⁴ K. Takahashi, K. Tanabe and al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*, Cell, 2007, 131 : 861-872.

- **reprogrammation sans transfert nucléaire**¹⁵: recherche des gènes exprimés dans les cellules embryonnaires murines pour les insérer dans les cellules somatiques (essai sur la queue de rat)
- **reprogrammation du noyau de cellules somatiques**¹⁶ induite par le **cytoplasme** des cellules reprogrammantes (ovocytes ou cellules souches embryonnaires animales)
- **dédifférenciation cellulaire « naturelle »** en cellules multipotentes (régénération cellulaire observée chez la salamandre par exemple) possible aussi chez le mammifère¹⁷
- **utilisation de petites molécules** pour induire la dédifférenciation en cellules multipotentes¹⁸
- **incubation de fibroblastes** dans une solution contenant un extrait de cytoplasme de cellules T (capables de donner naissances à plusieurs fonctions cellulaires)¹⁹

C/ Les iPS présentent des caractéristiques supérieures aux hESC²⁰

1/ Elles sont identiques aux patients : pas de rejet immunologique pour les IPS

Les iPS ont l'avantage de pouvoir être obtenues à partir de cellules directement prélevées sur le patient. Pour les applications thérapeutiques, c'est un avantage majeur car **les greffes ne présenteront pas de problèmes d'immuno-compatibilité. Les hESC, au contraire, déclenchent un rejet immunologique systématique** dans l'organisme receveur. Ce rejet est bien connu. Aucune solution n'y a été trouvée, à l'exception d'une thérapie immunosuppressive identique à celle mise en jeu dans les transplantations d'organes²¹.

« *Les cellules iPS étant obtenues à partir de cellules des patients, elles ne risqueraient effectivement pas d'être rejetées par le système immunitaire et ne nécessiteraient pas de prendre un traitement immunosuppresseur à vie* »²² : Anne-Lise Bennaceur-Griscelli, directrice de l'Institut André Lwoff, Professeur d'Hématologie à l'Université Paris-Sud 11 / Praticien Hospitalier (AP-HP) / Unité Inserm 602.

¹⁵ K.Takahashi, S.Yamanak, *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblasts Cultures by Defined Factors*, Cell, 25 August 2006, vol.126, n°4, pp.663-676.

¹⁶ I.S.Abuljadayel, *Induction of stem cell-like plasticity in mononuclear cells derived from immobilized adult human peripheral blood*, Current Medical Research and Opinions, 2003, vol.19, n°5, pp.355-375.

¹⁷ R.Y.L.Tsai, R.Kittappa, R.D.G.McKay, *Plasticity, Niches, and the Use of Stem Cells*, Developmental Cell, June 2002, vol.2, n°6, pp.707-712.

.S.J.Odelberg, *Inducing cellular dedifferentiation: a potential method for enhancing endogenous regeneration in mammals*, Seminars in Cell and Developmental Biology, October 2002, vol.13, n°5, pp.335-343.

¹⁸ X.Wu, S.Ding, Q.Ding, N.S.Gray, P.G.Schultz, *A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells*, Journal of the American Chemical Society, 11 December 2002, vol.124, n°49, pp.14520-14521.

.S.Chen, Q.Zhang, X.Wu, P.G.Schultz, S.Ding, *Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule*, Journal of the American Chemical Society, 21 January 2004, vol.126, n°2, pp.410-411.

.S.Kim, G.R.Rosania, Y-T.Chang, *Dedifferentiation? What's next?*, Molecular Interventions, April 2004, vol.4, n°2, pp.83-85.

¹⁹ A-M. Håkélien, H.B.Landsverk, J.M.Robl, B.S.Skålhegg, P.Collas, *Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts*, Nature Biotechnology, May 2002, vol.20, n°5, pp.460-466.

P.Collas, *Nuclear reprogramming in cell-free extracts*, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, series B, Biological Sciences, 29 August 2003, vol.358, n°1436, pp.1389-1395.

.C.K.Taranger, A.Noer, A.L.Sørensen, A.M.Håkélien, A.C.Bosquet, P.Collas, *Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells*, Molecular Biology of the Cell, December 2005, vol.16, n°12, pp.5719-5735.

.P.Collas, C.K.Taranger, *Epigenetic reprogramming of nuclei using cell extracts*, Stem Cell Reviews, 2006, vol.2, n°4, pp.309-317.

.Ph.Collas, *On the way to reprogramming cells to pluripotency using cell-free extracts*, Reproductive BioMedicine Online, June 2006, vol.12, n°6, pp.762-770.

²⁰ Ces caractéristiques sont décrites dans la publication K. Takahashi, K. Tanabe and al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*, Cell, 2007, 131 : 861-872 - J. Thomson and al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*, Science, 2007, 318 : 1917-1920.

²¹ k.H.Grinnemo, C.Syiven, O.Hovatta, G.Dellgren, M.Corbacio, *Immunogenicity of human embryonic stem cells*, Cell Tissue Research, Jan 2008, vol.331, n°1, pp.67-78.(Karolinska University Hospital, Stockholm)

.R-J.Swijnenburg, S.Schrepfer, J.A.Govaert, et al., *Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts*, Proceedings of the New York Academy of Sciences, 2 September 2008, vol.105, n°35, pp.12991-12996. (Howard Hughes Medical Institute and the Department of Microbiology and immunology, Stanford School of Medicine)

²² Article La Recherche N°426 - 01/2009 - PALMARÈS 20 08, "Les promesses des cellules iPS", Sophie Coisne

2/ Modélisation de pathologies

S. Yamanaka, dans un article citant sa publication princeps sur les cellules iPS²³ met la génération de modèles de maladies "in vitro" par la technologie iPS comme la première application pratique à venir de cette technologie. Il rappelle les travaux déjà effectués par Dimos et al (2008), avec génération de cellules iPS porteuses du gène mutant SOD à partir de cellules d'un patient atteint de **sclérose latérale amyotrophique (SLA)**. Il rappelle aussi les travaux de Park et al (2008), qui ont généré des cellules iPS de patients porteurs de **diverses pathologies (Parkinson, diabète juvénile)**. Ebert et al. (2009) ont fait de même avec les patients souffrants d'**atrophie musculaire** de la moelle épinière²⁴.

Dans Le Figaro du 3 avril 2009, Michel Pucéat, directeur de l'équipe cellules souches et cardiogenèse d'I-Stem (Inserm) déclare concernant les iPS : « *C'est une avancée importante. Les CSPi ont l'avantage de pouvoir être dérivées de n'importe quel patient dont nous désirons étudier la pathologie. Du coup, le nombre de leurs lignées se multiplie dans le monde.* »

3/ Elles évitent de passer par le clonage, technique non maîtrisée

Avant la découverte des IPS, certains chercheurs tentaient de dériver des cellules souches d'embryons à partir d'un embryon obtenu par clonage du patient. Mais personne n'y est parvenu (le clonage humain ne marche pas) alors que la méthode de Yamanaka permet d'obtenir ces cellules différenciées directement à partir du malade, sans clonage : plus efficace, plus sûr (car non seulement le clonage ne marchait pas mais on n'en connaissait pas les effets secondaires sur le développement des cellules) et donc plus rapide.

4/ Des essais cliniques ont déjà fonctionné sur un modèle animal atteint de drépanocytose : après irradiation des cellules malades, les cellules iPS obtenues ont été réinjectées et ont reconstitué le système hématopoïétique de l'animal²⁵.

5/ Une révolution : Aujourd'hui entre 200 et 300 laboratoires dans le monde travaillent déjà sur les cellules IPS et cette découverte n'a que 2 ans ! Elles ont révolutionné ce que l'on croyait impossible en matière de biologie moléculaire (rajeunir des cellules) et les obstacles inhérents à la technique ont déjà pu être dépassés.

- Pour **Jean-Claude Ameisen**, président du comité d'éthique de l'Inserm, "*le travail de Yamanaka véritable révolution scientifique, prouve qu'il est possible de reprogrammer des cellules adultes ordinaires et montre que la plasticité des cellules est beaucoup plus grande qu'on ne le pensait.*" Jean-Claude Ameisen relève aussi : "*10 ans se sont écoulés entre la première brebis clonée et les premiers primates clonés, 15 ans ont été nécessaires pour passer des cellules souches embryonnaires de souris aux cellules souches embryonnaires humaines et il a fallu à peine 1 année à S. Yamanaka pour passer de sa découverte sur l'animal à son application à l'homme.*"

- Dès juin 2008, le gouvernement japonais annonce la création d'un département spécifique de développement de la médecine de pointe sur les cellules iPS et ses prochaines applications cliniques²⁶. Le 2 juin 2009 le Rapport d'ambassade indique que le NEDO (*New Energy and Industrial Technology Development Organization*), organisme public japonais de financement et de gestion de projets de recherche et développement, vient d'annoncer le lancement d'un

²³ S.Yamanaka, *A fresh look at iPS cells*, Cell, 3 _April 2009, vol.137, pp.13-17

²⁴ Dimos JT, Rodolfa KT, KK Niakan, Science, 29 august 2008, vol.321, n°5893, pp.1218-1221.

Park LH, Arora N, Huo H, Cell, 5 september 2008, vol.134, n°5, pp.2008, pp.877-886.

Ebert AD, Yu J., Rose FF, et al., Nature, 15 january 2009, vol.457, n°7227, pp.277-280.

²⁵ J.Hanna, M.Wernig, S.Markoulaki, C-W.Sun, AS.Meissner, J.P.Cassady, C.Beard, T.Brambrink, L-C.Wu, T.M.Townes, R.Jaenisch, *Treatment of sickle Cell Anemia Mouse Model with iPSD Cells Generated from autologous Skin*, Scienceexpress, 6 December 2007, page 1.

²⁶ Compte-rendu de l' International Symposium on "Induced Pluripotent Stem (iPS) Cell Research - Frontier and Future - Mis en ligne en juin 2008 sur <http://sciencelinks.jp/fr/content/view/709/275/> Reported by department of Research Projectat, Japan Science Technoligy Agency .

programme sur 5 ans visant à développer des applications pour la technologie des cellules iPS. Le budget total du projet est de plus de 40 millions d'euros et une vingtaine d'organismes devraient participer aux recherches. Le programme se compose de trois axes majeurs :

- le développement de méthodes de production sûres et efficaces des cellules iPS ;
- la mise en place de méthodes de tri et de contrôle de la qualité des cellules ;
- l'établissement d'une méthode de criblage pour la recherche pharmaceutique.

6/ Une recherche éthique : les cellules IPS permettent des recherches *sans porter atteinte à l'intégrité de l'espèce humaine*. Par exemple, les mêmes précautions que pour les hESC doivent être prises avant de faire des applications cliniques pour éviter les risques oncogènes, mais au moins les recherches pour éviter ces risques oncogènes ne mettent pas en danger la vie d'un embryon et sont du coup plus rapides : seulement quelques semaines après la découverte en 2007, des équipes ont réussi à contourner ces risques.

Elles mettent fin au débat éthique.

Interview de Ian Wilmut, Genethique.org, 18 mai 2009

Généthique : Après la découverte des professeurs Yamanaka et Thomson¹, vous avez déclaré à la BBC que vous abandonniez le clonage et que, d'ici 5 ans, cette découverte "pourrait procurer une meilleure alternative, éthiquement plus acceptable que le clonage d'embryons humains pour la recherche médicale"². Quels sont les avantages des cellules iPS par rapport aux attentes et objectifs que vous aviez en clonant Dolly ?

Ian Wilmut : « Avant la découverte des cellules iPS, nous essayions de dériver des cellules souches d'embryons produits par le transfert d'un noyau cellulaire du patient souffrant d'une maladie héréditaire. A ce stade, personne n'a réussi. Mais maintenant, la dé-différentiation de cellules somatiques murines (méthode du Pr. Yamanaka) a démontré que le même objectif pouvait être atteint en utilisant directement les cellules somatiques des malades.

Il y a un avantage thérapeutique majeur avec les cellules iPS : elles sont génétiquement identiques au patient, permettent de modéliser des pathologies et de rechercher rapidement des médicaments pour traiter en amont les symptômes de la maladie. Il existe déjà une centaine de ces lignées cellulaires sur lesquelles on peut travailler sans attendre pour nous aider à comprendre les maladies d'ici 5 ans.

La technique du clonage n'est donc plus une technique d'actualité. Comme je l'ai expérimenté avec la brebis Dolly, cloner demande un temps considérable pour obtenir des cellules souches. De plus, cette technique implique forcément l'hyperstimulation ovarienne chez la femme : celle-ci doit subir un traitement hormonal intensif et pénible pour produire un grand nombre d'ovocytes et pour finalement n'obtenir que quelques embryons clonés. Si la science offre des pistes plus rapides, intéressantes et efficaces, je suis d'avis de les suivre. »