

Des avancées importantes dans le domaine de la médecine régénérative

Michel Monsigny, professeur émérite des Universités, Orléans

Le jeudi 5 mars 2009

L'enjeu des cellules souches.

Les cellules souches permettent de traiter divers pathologies. C'est en particulier le cas de la greffe de moelle osseuse réalisée en France depuis les années 80 pour traiter certains types de leucémie, le cas de la greffe de peau pour les grands brûlés ou encore du traitement des « enfants bulle » qui sont dramatiquement immunodéficients par manque d'une protéine clé de la défense de l'organisme (cf. le succès de la thérapie développée par l'équipe d'Alain Fischer à Paris). Les cellules souches pourraient permettre idéalement de soigner un patient avec des cellules spécialisées dérivant de ses propres cellules, ce qui éliminerait les limites de la transplantation d'organes ou même de cellules hétérologues (d'un autre donneur) à cause des problèmes d'histocompatibilité. Cette possibilité ouvrirait de façon spectaculaire les indications thérapeutiques.

Origine des cellules souches

Les cellules souches sont présentes dans tous les tissus en petit nombre. L'embryon est une source idéale du strict point de vue biologique puisque ces cellules sont **totipotentes** ou **pluripotentes** (voyez ci-dessous). Les embryons accessibles sont soit des produits « abandonnés » par un couple après un processus de fécondation *in vitro* soit des produits obtenus par transfert nucléaire d'un noyau d'une cellule somatique (c'est-à-dire de cellule non germinale) dans un ovocyte (clonage). Cependant, leur utilisation est limitée (voyez ci-dessous). Il est possible d'obtenir des cellules souches plus ou moins différenciées à partir de fœtus (en cas d'avortement ou de fausse couche), de la moelle osseuse, du sang de cordon ombilical, des menstrues, de la peau, des dents de lait, d'une liposuction, etc. En outre, des cellules souches peuvent être obtenues par reprogrammation de cellules adultes, ce sont les cellules pluripotentes induites : CSPi. (ou *iPS* en anglais).

Problèmes liés à l'utilisation des cellules souches totipotentes et pluripotentes

Les cellules souches hétérologues (c'est-à-dire non autologues : qui ne proviennent pas du patient lui-même) provoquent des réactions de rejet sauf si elles sont **immunologiquement** compatibles. Les antigènes d'histocompatibilité (HLA chez l'homme) font que les cellules hétérologues (celles d'un donneur autre que le receveur) sont reconnues comme étrangères à l'organisme.

En France, l'utilisation d'embryons surnuméraires est très réglementée et n'est autorisée que sur des embryons non utilisés par des couples qui ont bénéficié d'une aide médicale à la procréation, appelée « fécondation **in vitro**, F.I.V. ». En outre, la loi du 6 août 2004 dispose que cette autorisation est limitée dans le temps, en fait, jusqu'au 5 février 2011. Il est en outre interdit de fabriquer des embryons pour les seuls besoins de la recherche. De façon générale, l'utilisation des embryons pose un problème **éthique** fondamental : l'embryon étant biologiquement une personne humaine, en puissance.

L'obtention d'embryons exige un traitement hormonal de la femme afin de recueillir ovocytes au jour J. En outre, le nombre de cellules disponibles par embryon est faible : donc la quantité de matériel de départ est **limitée**.

Les cellules souches totipotentes et pluripotentes sont potentiellement **carcinogènes** : elles peuvent induire des tumeurs appelées tératomes. Elles peuvent, cependant être différenciées en cellules spécialisées qui sont soit multipotentes ou même unipotentes.

Les cellules souches adultes induites : est-ce une solution idéale ?

L'œuf initial donne naissance à plusieurs cellules qui vont se différencier et finalement fournir les quelque 220 types de cellules qui composent un corps humain. Initialement, les cellules de l'embryon sont totipotentes : elles peuvent former un individu ; puis elles se différencient en plusieurs types cellulaires qui sont pluripotentes, c'est à dire que dans les conditions *ad hoc* elles pourront se différencier en divers types cellulaires. En fonction de l'environnement, de la présence de facteurs et de l'état d'accessibilité des gènes (épigénèse), elles sont « commises » c'est-à-dire orientées dans une direction de différenciation donnée. Puis ces cellules se différencient un peu plus encore, elles ne sont plus alors que multipotentes ; enfin leur différenciation devient terminale : elles sont unipotentes : elles ne donnent qu'un type cellulaire. Tous les tissus de l'organisme se renouvellent, c'est-à-dire que tout le long de la vie des cellules souches génèrent des cellules qui remplacent les cellules qui meurent.

La nouveauté, en 2007, a été de démontrer que des cellules souches adultes différenciées (probablement unipotentes) pouvaient être reprogrammées en cellules **pluripotentes** à condition d'intégrer les gènes de 4 protéines connues pour être présentes dans les cellules

embryonnaires précoces : ce sont des « facteurs de **dédifférenciation** » : *Oct 3/4, Sox2, c-Myc and Klf4*. De cette façon, les facteurs sont produits à l'intérieur des cellules pendant un temps suffisant (plusieurs jours) pour qu'elles acquièrent les caractéristiques de cellules pluripotentes. Ces cellules peuvent être multipliées et, à volonté, différenciées en diverses cellules spécialisées à condition de les cultiver en présence de facteurs (de croissance et de différenciation) appropriés. Il est donc possible d'obtenir des fibroblastes, des cellules cardiaques, des cellules neurales, etc. Ces résultats ont été publiés en même temps en 2007 par deux équipes : une japonaise dirigée par **Shinya Yamanaka** dans « Cell » et une américaine dirigée par **James Thomson** dans « Science » ; « Cell » et « Science » sont des journaux internationaux de très haut niveau.

Cependant, cette approche présente un inconvénient grave : les cellules ainsi obtenues à partir des cellules pluripotentes sont strictement inutilisables en thérapie humaine. En effet, pour faire exprimer (produire) les facteurs de dédifférenciation à l'intérieur des cellules qui vont devenir pluripotentes, il faut introduire les gènes de façon efficace. Les auteurs ont utilisé un rétrovirus (ou un lentivirus) qui permet un rendement élevé, mais qui, en contrepartie, s'intègrent dans le génome de la cellule et ils y restent. De tels rétrovirus risquent d'induire des cancers chez le receveur. Les autres moyens utilisables qui ne présentent pas cet inconvénient sont les adénovirus ou les plasmides : dans ces cas, il n'y a pas intégration, mais malheureusement la quantité de facteurs de dédifférenciation produits à l'intérieur des cellules est dramatiquement faible, donc ils ne sont pas utilisables.

L'idéal serait un système permettant une intégration réversible des gènes des facteurs de dédifférenciation. Et bien, c'est exactement ce que 2 équipes, l'une britannique dirigée par **Keisuke Kaji**, Université d'Edinburgh et l'autre canadienne dirigée par **Andras Nagy**, Mount Sinai Hospital, Toronto, viennent de réaliser. Leurs articles sont publiés dans « Nature », un autre journal international de très haut niveau. Ils ont reprogrammé des fibroblastes fœtaux murins et humains en utilisant un transposon : le transposon est une structure nucléique spécialisée dans l'intégration et le détachement de segments chromosomiques de type « copiez-collez ». La découverte des transposons est due à **Barbara McClintock** au début des années 50 ; ce chercheur a reçu le Prix Nobel de médecine en 1983. Le génome humain contient une énorme quantité de segments de type transposons ou de segments qui dérivent de transposons. En l'occurrence, ces auteurs ont utilisé un transposon isolé d'un papillon de nuit, l'arpenreuse du chou. L'outil utilisé contient les gènes des 4 facteurs de dédifférenciation, et est appelé « **piggyBac** ». Cette technique permet de transfecter pratiquement n'importe quel type de cellules somatiques, de laisser les facteurs protéiques issus des gènes introduits jusqu'à une complète transformation des

cellules en cellules pluripotentes, et enfin d'éliminer complètement le transposon pour obtenir des cellules pluripotentes **dont le génome ne conserve aucune trace du transposon**. Ainsi, les 4 facteurs sont éliminés, y compris le c-Myc, un oncogène dont le rôle est de forcer les cellules à se diviser : ce point est capital.

Les cellules pluripotentes ainsi obtenues peuvent être multipliées puis différenciées en cellules multipotentes, et unipotentes et peuvent donc donner accès aux différents types cellulaires souhaités en vue d'une application thérapeutique. Les cellules différenciées ne conduisent vraisemblablement pas à des tératomes, contrairement aux cellules totipotentes (et /ou) pluripotentes. Toutefois, ce point reste à vérifier.

Conclusions

Les cellules pluripotentes humaines deviennent, grâce à ce nouveau pas, des candidats utilisables en thérapie humaine. Il reste évidemment à mettre au point les étapes suivantes de re-différenciation dans des conditions requises pour obtenir l'autorisation de traiter un patient. Cependant contrairement aux autres cellules souches, cette approche ne souffre de limitation

- ni du **point de vue éthique**, contrairement aux cellules issues d'embryons ou aux cellules souches obtenues par transfert de noyau dans des ovocytes humains (clonage non reproductif),

- ni du **point de vue immunologique**, puisque les cellules somatiques d'un patient pourront être transformées en cellules pluripotentes puis en cellules différenciées pour l'injection **au même patient**,

- ni du **point de vue technique**, contrairement aux techniques virales qui sont limitées par la lourdeur de la préparation de quantités importantes de virus pour réaliser la transfection, ou au sang de cordon congelé dans l'attente d'une éventuelle utilisation en cas de maladies hématopoïétiques (maladies des cellules du sang ou du système immunitaire). La congélation du sang de cordon, dans cette perspective, est d'ailleurs interdite en France, pour le moment.

Les cellules pluripotentes ainsi obtenues ouvrent la voie à divers aspects de la thérapie cellulaire et de thérapie génique pour combattre des maladies monogéniques comme la mucoviscidose, la chorée d'Huntington, etc., des pathologies neurodégénératives, cardiaques ou pour réparer des traumatismes comme des atteintes de la moelle épinière. Cette première décennie du 21^e siècle transforme les perspectives de la médecine en dégageant les obstacles qui nous séparent de la médecine régénérative.

Cependant, il faudra attendre que les essais cliniques confirment la faisabilité thérapeutique et précisent les affections qui seront réellement susceptibles d'être traitées efficacement par thérapie cellulaire sans provoquer des pathologies secondaires telles que l'induction d'une tumeur.