

2. SESSION II : CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES, ETHIQUE ET THERAPIE CELLULAIRE

Les cellules souches pluripotentes, qui comprennent les cellules souches embryonnaires et les cellules souches pluripotentes induites (iPS) sont d'identification relativement récente chez l'homme. Leurs capacités extraordinaires de prolifération et de différenciation en font une source très attractive de cellules médicaments pour la médecine régénérative. Mais les espoirs immenses dont sont dépositaires les cellules souches pluripotentes alimentent également certains malentendus entre les chercheurs et les patients, et nourrit les appétits de certains charlatans.

2.1. Cellules souches embryonnaires

2.1.1. Cellules souches pluripotentes : définir la pluripotence

Les cellules souches (cf. 1.4) sont diverses et présentent des capacités de différenciation et de multiplication très différentes selon leur origine. On peut schématiquement distinguer, en fonction du spectre de cellules différenciées qu'elles sont capables de produire :

- les cellules souches unipotentes qui ne génèrent qu'un seul type cellulaire différencié : les cellules souches dites « satellites » du muscle squelettique ne sont capables de former que des cellules musculaires.
- les cellules souches multipotentes qui sont capables de générer plusieurs types cellulaires différenciés : par exemple, les cellules souches sanguines (« hématopoïétiques ») sont capables de former des globules rouges, des plaquettes, ainsi que tous les types de globules blancs du corps humain : lymphocytes, polynucléaires et monocytes.
- les cellules souches pluripotentes qui sont capables de générer tous les types cellulaires différenciés de l'organisme adulte, y compris les gamètes: les seuls exemples unanimement reconnus par la communauté scientifique sont la cellule souche embryonnaire (CSE) et la cellule souche pluripotente induite (iPS).
- les cellules totipotentes qui sont capables de générer un être humain entier à partir d'une seule cellule. Le seul exemple connu de cellule totipotente est l'ovocyte fécondé et les cellules (blastomères) qui en sont issues par division cellulaire, après une division (embryon au stade deux cellules) ou après deux divisions (embryon au stade de quatre cellules). La démonstration naturelle de la propriété de totipotence est apportée par la naissance des « vrais » jumeaux (les jumeaux « homozygotes ») et par les très rares quadruplés homozygotes rapportés dans la littérature

médicale. Les cellules totipotentes ne sont pas des « cellules souches » car elles ne s'autorenouvellent pas. En effet, elles perdent très vite (une ou deux divisions cellulaires) leur propriété de totipotence.

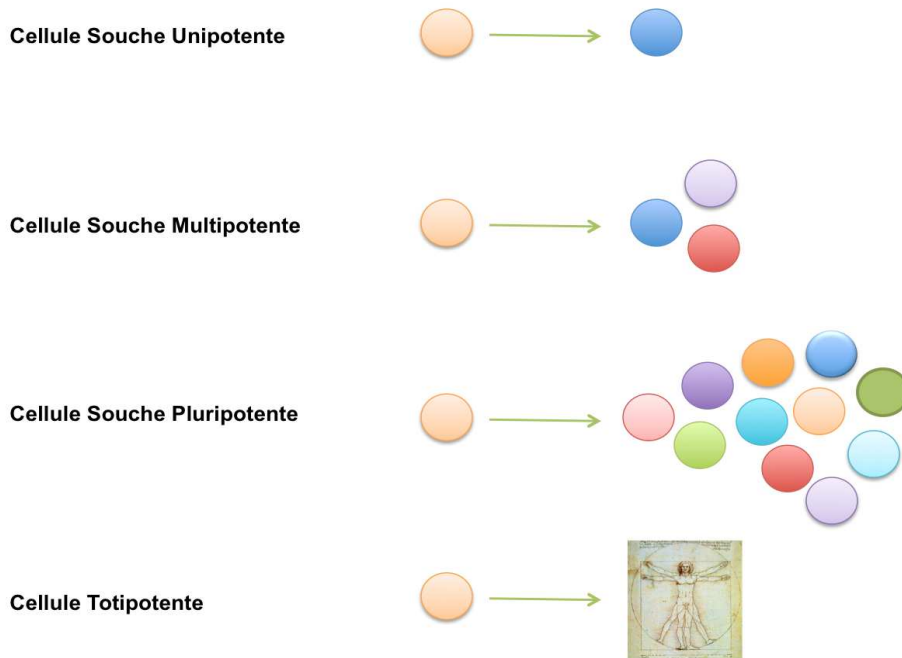


Figure 1 : Les différents types de cellules souches en fonction de leur capacité à générer des cellules différentes.

2.1.2. Obtention et culture des cellules souches embryonnaires in vitro

Les cellules de l'être humain adulte ont des capacités de différenciation limitées. Pour envisager de réparer un tissu endommagé par l'ajout de nouvelles cellules (thérapie cellulaire), la cellule idéale serait une cellule qui aurait la capacité de se transformer en n'importe quelle cellule (pluripotence) de façon à pouvoir réparer un dommage cellulaire dans n'importe quel organe. Les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) ont été les premières cellules pluripotentes obtenues chez l'homme de manière reproductible.

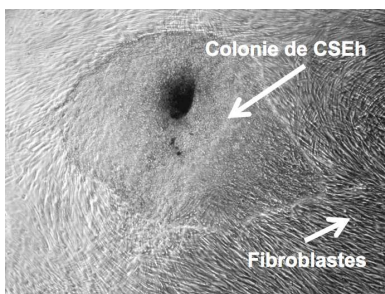


Figure 2 : vue sous microscope d'une colonie d'une lignée de CSEh (la lignée HD90) en culture sur un tapis de fibroblastes nourriciers.

Les CSEh sont obtenues par mise en culture de la masse cellulaire interne de l'embryon du stade « blastocyste » (aux environs du 5^{ème} jour du développement humain). Voir ci-dessous l'encadré « Complément d'information : développement embryonnaire précoce : les origines des cellules souches embryonnaires », ainsi que l'encadré

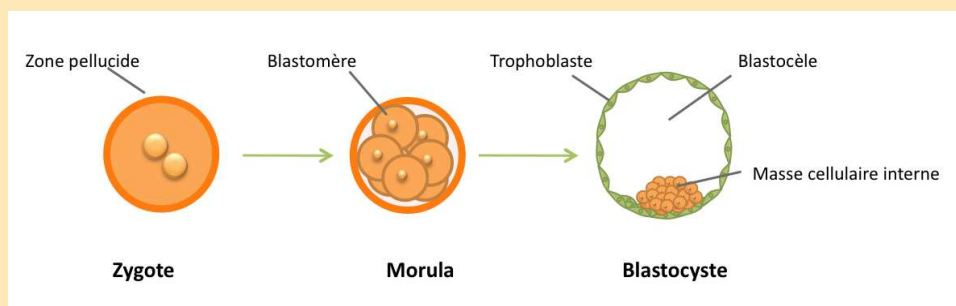
« Complément d'information – Dons d'embryons à la recherche en France ». Cette technique a tout d'abord été développée chez la souris en 1981 et cette découverte a valu le prix Nobel de médecine en 2007 à l'Anglais Martin Evans l'un de ses découvreurs. En 1998, l'équipe de l'Américain James Thomson a montré que l'on pouvait également obtenir des cellules souches embryonnaires chez l'homme à partir d'embryon humain. Des conditions de culture bien précises sont nécessaires pour préserver les propriétés de pluripotence des cellules de la masse cellulaire interne de l'embryon. Elles sont différentes chez la souris et chez l'homme, et la description exacte des ingrédients de ces recettes de culture dépasse le cadre de cette revue, mais l'on peut citer la nécessité de cellules nourricières (en général une sorte de cellule appelée fibroblastes), d'un milieu de culture riche et d'une combinaison de facteurs de croissance.

En culture, les cellules de la masse cellulaire interne continuent de proliférer intensément. Si l'on prend soin de changer quotidiennement le milieu de culture et de repiquer une fois par semaine les CSEh en divisant les colonies en plus petits morceaux, cette prolifération est infinie. Ce sont là deux propriétés cardinales des CSEh : prolifération intense, prolifération infinie. Ce sont les seules cellules normales (et en disant cela on exclut les cellules cancéreuses) qui ont la propriété de proliférer indéfiniment. Les CSEh sont d'autre part capables de se différencier en n'importe quel type de cellule, et toute la difficulté de la culture des CSEh est de les maintenir pluripotentes (indifférenciées) et d'empêcher leur différenciation. Le respect strict des conditions de culture citées ci-dessus et une surveillance quotidienne des cellules sont nécessaires pour maintenir les CSEh à l'état de pluripotence.

Complément d'information - Développement embryonnaire précoce : les origines des cellules souches embryonnaires

Pour comprendre l'origine des CSE humaines (CSEh), et en quoi leur obtention résulte en la destruction d'un embryon humain, il faut expliciter ici la première semaine du développement de l'être humain. La fusion des cellules reproductrices femelle (ovule) et mâle (spermatozoïde) aboutit à la formation d'un zygote, c'est à dire de l'ovule fécondé ou encore la toute première cellule d'un être vivant (voir Figure ci-dessous). Le zygote est entouré par une membrane appelée la zone pellucide. Dans les 24 heures après la fécondation, le zygote va commencer à se diviser en deux cellules. Les deux cellules filles sont appelées blastomères. Chaque blastomère va ensuite à son tour se diviser pour aboutir à un embryon à 4 cellules (ou 4 blastomères) vers le deuxième jour, puis 8 blastomères vers le troisième jour, etc. Au quatrième jour du développement humain, l'embryon comporte environ 30 cellules encore clairement individualisables et est appelé à ce stade « *morula* » (« petite

mûre »). Puis les cellules de l'embryon changent de morphologie, se compactent, et une cavité liquidienne commence à se former à l'intérieur de l'embryon, le blastocèle. A ce stade, l'embryon est appelé blastocyste. C'est la première étape de différenciation cellulaire du développement humaine. En effet, la périphérie du blastocyste est constituée d'une couche de cellules aplaties hexagonales appelées trophoblaste, d'un centre liquidien, et accolé à l'intérieur du trophoblaste, une grappe de cellules appelée « masse cellulaire interne ». Le trophoblaste est la partie de l'embryon qui va donner naissance à la constitution du placenta, tandis que la masse cellulaire interne va donner naissance au fœtus. Autrement dit, les quelques dizaines de cellules de la masse cellulaire interne ont une capacité de différenciation très large puisqu'elles vont donner naissance à tous les tissus qui forment le bébé : peau, muscle, cœur, foie, cerveau, poumons, reins, etc.



On comprend donc que les cellules de la masse cellulaire interne soient *pluripotentes*. Mais *in vivo*, au cours du développement humain normal, la masse cellulaire interne se développe et se différencie très rapidement, pour aboutir à un embryon humain comportant les ébauches de tous les organes moins de trois mois après. La propriété extraordinaire de pluripotence est donc éphémère au cours du développement normal. L'exploit a donc été d'identifier des conditions de culture dans lesquelles les cellules de la masse cellulaire interne conservent leur capacité de pluripotence.

Complément d'information – Dons d'embryons à la recherche en France

Il a longtemps été interdit d'effectuer une recherche sur l'embryon humain. Depuis la révision de la loi de Bioéthique de 2004, bien que la loi indique toujours que « La recherche sur l'embryon humain est interdite. (Art. L. 2151-5) », une dérogation autorise la recherche sur ce dernier. Cependant, un certain nombre de conditions doivent être remplies pour qu'une telle recherche soit possible :

- les embryons doivent être conçus *in vitro* dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation et ne plus faire l'objet d'un projet parental. Autrement dit, il n'est pas possible de concevoir des embryons humains uniquement dans le but d'effectuer une recherche. Au

contraire, cette recherche n'est possible que sur des embryons conçus dans le cadre de la fécondation in vitro (FIV) et sans projet parental, c'est à dire voués de toute façon à la destruction :

- . le couple a suffisamment d'enfants ou
 - . le couple est séparé ou un de ses membres est décédé
 - . l'embryon est porteur d'une maladie génétique grave (dans le cadre du diagnostic pré-implantatoire), ou
 - . l'embryon est de qualité insuffisante pour permettre sa réimplantation utérine ou sa congélation
- 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, est obligatoire.
 - le consentement des deux membres du couple est révocable à tout moment et sans motif.
 - Une autorisation par l'**Agence de la biomédecine**, qui évalue la pertinence du projet scientifique, les financements et l'infrastructure dont dispose l'équipe demandeuse, est nécessaire.

2.1.3. *Potentiel des CSEh*

Les CSEh sont capables de donner n'importe quel type cellulaire. Qu'est-ce que cela veut-il dire? En pratique, à tout moment de la culture des CSEh, que ce soit au départ ou bien plusieurs années après, il suffit de changer les conditions de culture pour induire une différenciation des CSEh. Ces nouvelles conditions de culture sont décrites dans un « **protocole de différenciation** ». Le protocole est similaire à une recette de cuisine et indique tous les détails qu'il faut appliquer pour obtenir la cellule de votre choix : milieu de culture, facteurs de croissance, support de culture, etc. Le choix du protocole va bien sûr conditionner la direction de la différenciation : certains protocoles induisent la production de cellules sanguines, d'autres des cellules nerveuses, des cellules du foie, des cellules musculaires, des cellules cardiaques, etc. Il est par exemple relativement aisé d'obtenir *in vitro*, dans une boîte de pétri, des amas de CSEh qui se sont différenciées en cellules du

cœur (« cardiomyocytes ») et qui battent de manière synchrone, à la manière du cœur !

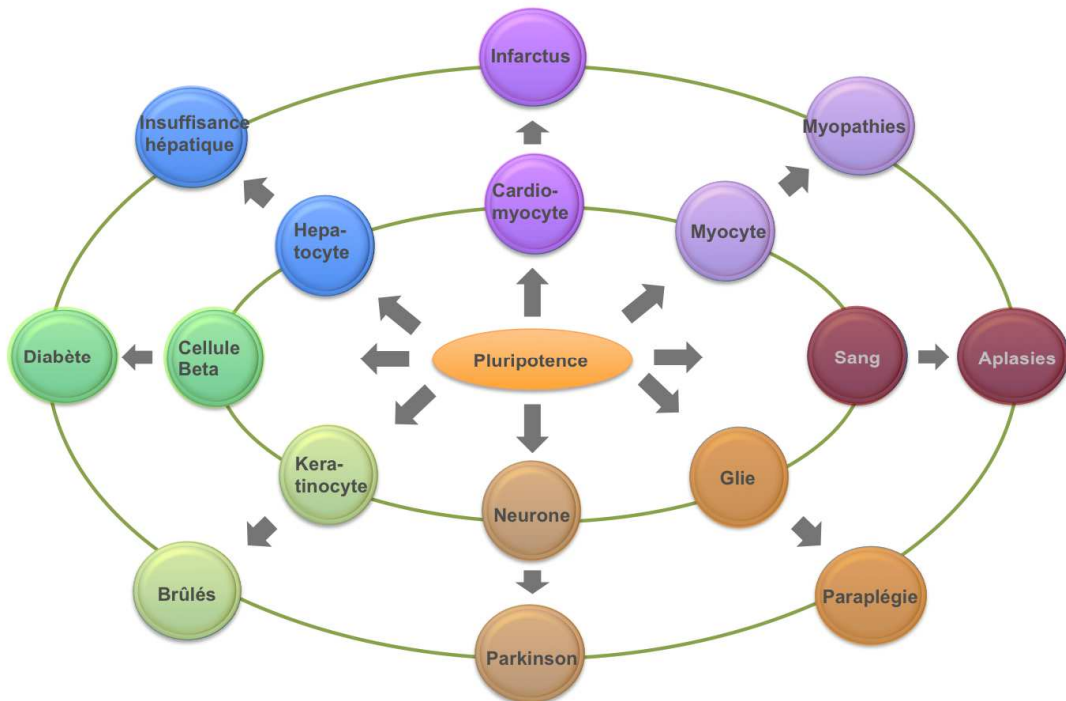


Figure 3 : Potentiels de différenciation des CSEh et par extension leur potentiel thérapeutique

Ainsi, le potentiel des cellules de la masse cellulaire interne de l'embryon, cellules capables de fabriquer tous les organes de l'organisme, est retrouvé chez les CSEh qui sont capables de générer toutes sortes possibles de cellules et tissus *in vitro*. Les CSEh sont bien un concentré de promesses pour la thérapie cellulaire et la médecine régénérative ! Comme les CSEh sont capables de croître abondamment et sans limites, elles sont une source illimitée de cellules neuves : des cellules médicaments que l'on pourra injecter dans un organe malade qui a perdu une partie ou totalité de ses cellules d'origine.

Complément d'information – Existe-t-il des cellules souches pluripotentes chez l'adulte ?

De nombreuses publications scientifiques rapportent l'identification de cellules souches chez l'adulte pouvant se différencier en de très nombreux types cellulaires, voire en tout type cellulaire, ce qui est la définition des cellules souches pluripotentes. Cependant, ces cellules souches sont d'origine très variable, les conditions d'obtention très hétéroclites, leurs propriétés différentes selon leurs auteurs. De fait, ces cellules ont selon les travaux été nommés différemment : MAPC, USSC, AFS, MIAIMI, SKP, MUSE, etc. La grande limite de ces résultats est que ces travaux sont très peu, voire jamais, reproduits sinon que par ceux qui les ont publiés au départ. La non reproductibilité des résultats par la communauté scientifique témoigne au mieux d'une grande complexité dans la mise en œuvre de ces techniques, et au pire de travaux insuffisamment étayés avant publication. C'est pourquoi l'on peut dire que les CSEh et les iPS (cf. infra) sont les seules cellules souches pluripotentes que l'on peut obtenir de manière reproductible.

2.1.4. CSE et modèles animaux : succès et réserves

Les CSEh sont donc très prometteuses, mais avant de les injecter à des patients en attente d'un traitement, il faut procéder à des essais, en particulier sur des modèles animaux (voir chapitre 2.3.6).

Les scientifiques et médecins ont depuis longtemps développé des animaux, en particulier des souris et des rats, mais aussi parfois de plus gros animaux tels que des moutons, des porcs ou des chiens, présentant des pathologies mimant avec plus ou moins de fidélité des pathologies humaines. Ces « modèles animaux » de pathologies humaines sont très utilisés pour tester des médicaments ou des thérapies cellulaires, pour à la fois vérifier l'efficacité des traitements proposés et leur innocuité.

Des centaines d'essais ont déjà eu lieu et bien d'autres sont en cours ou sont à l'état de prévision. A titre d'illustration, voici deux essais récents qui ont utilisé des CSEh pour tenter de corriger des modèles animaux de maladies humaines.

- modèle de maladie de parkinson

Le premier essai a utilisé un modèle de maladie de Parkinson. Comme chez l'homme, les troubles sont dus à la disparition de neurones « dopaminergiques »

dans une zone précise du cerveau. L'équipe américaine de Steven Goldman est partie de CSEh qu'elle a fait différencier en neurones dopaminergiques in vitro. A l'issue de cette différenciation, parmi les cellules en culture, on a trouvé environ 40% de neurones, dont presque 70% de neurones dopaminergiques qui constituent les « cellules médicaments ». Pour tester leur efficacité, ces neurones ont été transplantés dans la zone endommagée du cerveau des rats et les chercheurs ont comparé l'évolution des signes de la maladie chez les animaux traités et les animaux non traités (animaux contrôles). Huit semaines après l'injection, la condition des animaux traités avec les neurones dopaminergiques était très significativement améliorée, tandis que la condition des rats contrôles continuait à se dégrader. Bien que ces résultats soient très encourageants, les auteurs concluaient leur travail par une mise en garde : au site d'injection, on pouvait observer des zones de cellules humaines proliférantes qui ne s'étaient pas différenciées. . Aussi, une première conclusion de ces travaux est que les CSEh sont une bonne source de « cellules médicaments » pour soigner une vaste gamme de pathologies humaines dégénératives, mais à condition de trier les cellules médicaments pour ne pas injecter de cellules restées indifférenciées.

Une parfaite illustration de l'ambivalence de nombreux traitements, dont les CSEh : comme Dr Jekyll and Mr Hyde, elles sont une source de cellules pour régénérer les organes malades, mais leur exubérance proliférante pose le problème de leur dangerosité si l'on ne prend pas soin de purifier les cellules médicament avant leur injection.

- le modèle du diabète sucré

La mise au point d'un protocole de différenciation des CSEh en cellules pancréatiques sécrétant de l'insuline fait également intervenir des étapes successives de différents milieux de culture et facteurs de croissance ¹. Les protocoles les plus aboutis permettent d'obtenir au bout de 12 jours de culture des cellules immatures mais engagées dans une voie de différenciation vers la cellule beta de Langerhans qui sécrète de l'insuline. Ces cellules immatures sont injectées sous la peau de souris rendues diabétiques et l'on constate leur quasi-guérison. Mais là encore on constate, en faisant l'analyse détaillée des cellules au point d'injection dans la souris, chez un petit nombre (moins de 10%), le développement

¹ Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. Nat Biotechnol. 2008 Vol. :26:443-52. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo.

de tumeurs non malignes (tératome). Bien que leur fréquence et leur taille soient réduites, ces effets secondaires demeurent préoccupants. Une réponse à ce risque pourrait être un système de petit sac aux parois poreuses dans lequel seraient retenues les CSEh pour éviter toute dissémination de ces cellules chez le patient traité. Les parois étant poreuses, les cellules à l'intérieur du sac sont nourries par diffusion des nutriments présents dans le corps du patient, et l'insuline qu'elles produisent passe directement dans la circulation sanguine.

2.1.5. Les principaux écueils des thérapies par CSEh

De nombreux travaux ont été publiés montrant que les CSEh sont à la hauteur des espérances et constituent une source de cellules médicaments pour un grand nombre de pathologies humaines.

Plusieurs difficultés existent concernant l'utilisation des CSEh en thérapeutique.

Le rejet par le système immunitaire.

Les CSEh sont issues d'un embryon, dont la probabilité d'être compatible sur le plan immunitaire (« compatibilité HLA ») avec un patient est extrêmement faible. En l'absence de compatibilité, un traitement par cellules issues de CSEh est envisageable uniquement sous un traitement médicamenteux lourd par immunosuppresseurs comme pour une greffe d'organe. Cependant, dans l'exemple des cellules sécrétant de l'insuline développées, la séparation entre cellules issues des CSEh et l'organisme receveur par un film plastique poreux évite que le système immunitaire du patient ne rejette les cellules sécrétant l'insuline, un tel rejet nécessitant un contact direct.

- Apparition d'anomalies génétiques

La culture cellulaire *in vitro* est totalement artificielle et ne mime que très infidèlement les conditions de vie cellulaire *in vivo*. Dans ces conditions apparaissent fréquemment des cellules portant des anomalies génétiques, qui sont précancéreuses. Il faudra donc envisager de contrôler la production de cellules médicament, et d'éliminer de la production tout lot comportant des anomalies génétiques.

2.1.6. Utilisation des CSEh en thérapie humaine

Les CSEh n'ont pas encore été administrées à l'homme, en tout cas pas dans des pays occidentaux dans le cadre d'essais contrôlés. Pour envisager leur utilisation en thérapeutique, comme pour tout essai de thérapie cellulaire, il faut pouvoir répondre aux questions suivantes:

- quelle pathologie est candidate pour un tel traitement ?
- dans la pathologie candidate, quelles cellules sont malades?
- quelle cellule peut-on obtenir par différenciation in vitro à partir de CSEh pour remplacer ces cellules malades? Il faut définir la voie de différenciation, mais aussi le stade de différenciation souhaité : suffisamment différencié afin d'être rapidement efficace pour soigner la maladie, d'éviter l'écueil de la prolifération incontrôlée des cellules indifférenciées. Mais la différenciation ne doit pas être complète car il faut que la cellule médicament soit capable de s'intégrer dans l'organe qu'elle doit soigner et y survivre à long terme. Les cellules les plus différenciées ne pourraient pas remplir ces conditions là.
- définir les critères de sécurité : intégrité génétique, stade de différenciation correct (voir 2.1.4).
- définir les critères de succès : taux d'intégration dans l'organe, capacité à assurer la fonction qui faisait défaut, persistance dans le temps des cellules injectées.

Plusieurs essais sont en cours de demande d'agrément, tous au Etats-Unis auprès de la FDA (voir 2.6 le chapitre concernant la réglementation des essais cliniques). Comme développé dans les chapitres 2.4 et 2.5, il faut du temps pour répondre aux critères énumérés ci-dessus, et transformer les promesses théoriques en produit sûr et efficace que l'on peut injecter à un patient !

DEBATS ETHIQUES

L'usage des CSEh en thérapeutique heurte les sensibilités de certains. En effet, ces cellules sont issues d'embryons humains ayant été détruits à un stade très précoce du développement. Ces embryons auraient de toute façon été détruits, même en dehors de la recherche. Mais la genèse des CSEh entraînant la destruction

d'embryon humain, les CSEh soulèvent des débats éthiques important en France et dans de nombreux pays (cf. supra, Complément d'information – Dons d'embryons à la recherche en France). De plus, les CSEh posent le problème du nombre limité d'embryons utilisables pour la recherche ou, le cas échéant, pour la thérapeutique : nombre certainement insuffisant si un usage important des CSEh émergeait en médecine dans le futur. A certaines de ces remarques, la reprogrammation cellulaire, abordée dans le chapitre 2.2 apporte des solutions, notamment sur la compatibilité immunitaire, sur la source cellulaire et la destruction des embryons.

2.2. iPS et reprogrammation cellulaire : la pierre philosophale en biologie !

2.2.1. Une brève histoire de la reprogrammation

La notion de reprogrammation cellulaire remonte aux années 50, quand les biologistes se sont posés la question de savoir si la *différenciation*, qui fait passer une cellule immature à un état mature, était un phénomène réversible ou non, et si la cellule différenciée demeurait dans un état stable ou non. En effet, dans la nature et par exemple lorsque l'on regarde l'être humain, la différenciation est essentiellement un phénomène irréversible ! Prenez les cellules de la peau de votre visage. Ce sont des cellules matures, assurant la fonction de la peau : protection contre les agressions extérieures et rôle esthétique. Chaque matin, devant votre miroir, vous pouvez constater que ces cellules sont restées des cellules de la peau : elles ne sont pas redevenues embryonnaires ni se sont transformées en cellules d'un autre type (cerveau ou foie par exemple !). Heureusement ! Mais si en général la différenciation est irréversible et stable, **peut-on artificiellement inverser le processus de la différenciation et rajeunir une cellule adulte ?**

Les premières expériences effectuées sur la grenouille dans les années 50 ont montré la possibilité de faire régresser des cellules de l'intestin au stade embryonnaire. Mais l'expérience la plus célèbre dans ce domaine fut la création de **Dolly** en 1997. L'équipe de l'Écossais Ian Wilmut a pris un ovule de mouton dont il a remplacé le noyau par celui d'une cellule de la mamelle d'une brebis². L'ovule a

² Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Nature. 1997 Feb 27;385(6619):810-3. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.

changé le programme du noyau de la cellule de mamelle et l'a reprogrammé en embryon qui a alors commencé à se développer pour ensuite être réimplanté dans l'utérus d'une autre brebis - une brebis porteuse. L'agneau ainsi né, Dolly, était la copie conforme, c'est à dire la copie génétique (comme des vrais jumeaux, ou encore « clone ») de la brebis ayant au départ donné une cellule de mamelle. **Cette technique est appelée « clonage »** et a depuis été appliquée à de nombreuses espèces animales dont la souris, la vache, le chien, etc. Le clonage « reproductif » humain est interdit dans les pays ayant légiféré dans ce domaine. Mais si ces expériences étaient la preuve vivante qu'il est possible d'inverser totalement la différenciation et de rajeunir une cellule (plus exactement le noyau d'une cellule) jusqu'à la faire revenir à l'état d'embryon du premier jour, la technique du clonage fait intervenir la transplantation d'un noyau d'une cellule très particulière et rare, l'ovule. C'est donc une technique très délicate et très peu efficace (des centaines de tentatives sont souvent nécessaires pour un animal cloné vivant) et peu contrôlée puisque faisant intervenir une cellule entière. Il apparaissait qu'il serait difficile d'appliquer la technique du clonage à large échelle pour une application thérapeutique au profit du traitement des pathologies les plus fréquentes telles que l'infarctus du myocarde ou le diabète.

Est il possible de reprogrammer des cellules adultes, de manière plus contrôlée, par l'utilisation de facteurs définis et en nombre limité était il envisageable ? Pour la plupart des scientifiques la réponse à cette question était alors négative : « trop de facteurs en jeu, trop compliqué, etc. ». Pourtant, en 2006, le Japonais Shinya Yamanaka et son équipe rapportèrent l'observation selon laquelle le simple démarrage forcé de 4 gènes normalement utilisés par la cellule au stade embryonnaire permettait de reprogrammer une cellule adulte en cellule de type embryonnaire, indistinguishable des CSEh décrites ci-dessus.

2.2.2. La reprogrammation : les iPS et leurs enjeux

La reprogrammation par expression forcée de quelques gènes permet de générer des « cellules souches pluripotentes induites » (en anglais : induced pluripotent stem cells) dont l'acronyme consacré est « iPS ».

Ces résultats ont rapidement été reproduits par d'autres groupes internationaux et les résultats initiaux obtenus sur des cellules de souris ont été étendus à des cellules humaines. La relative simplicité de la procédure – la technique est parfaitement reproductible - et les enjeux scientifiques et médicaux extraordinaires expliquent l'explosion de la recherche sur les iPS dans les laboratoires autour de la planète.

Quels sont les enjeux ? Le principal est d'obtenir des cellules souches pluripotentes indépendamment des CSEh et de la technologie du clonage. Par rapport au CSEh, voici les avantages de la technologie iPS :

- permet d'obtenir des cellules souches pluripotentes à partir des cellules d'un patient, quel que soit son âge ou sa maladie : cela ôte en particulier le problème de l'incompatibilité immunologique entre une lignée de CSEh et un patient puisqu'on pourra imaginer traiter un patient avec ses propres iPS
- ne nécessite ni destruction d'embryon, ni recrutement d'embryons surnuméraire.
- permet d'envisager d'obtenir des cellules souches pluripotentes à partir de n'importe quel individu, y compris des patients porteurs d'anomalies génétiques : dans ces cas-là, la lignée d'iPS sera aussi porteuse de l'anomalie et pourra servir d'étude pour comprendre et développer de nouveaux traitements (voir le Complément d'information – Autres applications des iPS).

Complément d'information – Autres applications des iPS

Outre l'utilisation des iPS en médecine régénérative, d'autres applications sont possibles :

- **tester les nouveaux médicaments *in vitro*** sur les iPS, ou bien sur des cellules différenciées à partir d'iPS. En effet, une grande partie des nouvelles molécules candidates à devenir les médicaments de demain se révèle trop toxique pour être utilisée en médecine. Prédire cette toxicité est encore très difficile. Les iPS sont potentiellement une source illimitée de cellules pour effectuer ces tests. Des nouvelles molécules toxiques sur les iPS seraient des médicaments dangereux pour l'embryon donc à proscrire chez la femme enceinte. Des nouvelles molécules qui seraient toxiques sur, par exemple, des cellules cardiaques différenciées à partir d'iPS seraient potentiellement dangereuses pour un usage chez l'homme par effet secondaire sur le cœur. Etc.

- **comprendre le développement de l'être humain.** Il n'est pas possible, pour des raisons éthiques évidentes, d'étudier le développement humain sur des embryons ou fœtus vivants au-delà du stade blastocyste. Or les enjeux scientifiques et médicaux de la connaissance du développement embryonnaire humain sont considérables. En étudiant les iPS et leur différenciation organe par organe *in vitro*, l'on pourra mieux comprendre cette étape essentielle de la vie d'un être humain.
- **établir des modèles de pathologie *in vitro*** : en dérivant des iPS à partir de patients porteurs de maladies génétiques ou de variants génétiques les prédisposant à des pathologies (par exemple l'hypercholestérolémie, etc.), on pourra obtenir des modèles *in vitro* de ces pathologies, en différenciant les iPS dans le type de cellule responsable de la pathologie étudiée.

2.2.3. Quand on a trouvé la pierre philosophale, qu'en fait-on ?

Sur le plan des thérapeutiques la technologie iPS permet donc de rajeunir les cellules d'un patient, et une fois que ces cellules sont au stade iPS, de les faire différencier dans le type cellulaire désiré. Il est donc possible aujourd'hui de partir de cellules de la peau (par exemple des fibroblastes cutanés), de les reprogrammer en iPS, et ensuite de différencier ces iPS en cellules cardiaques. Autrement dit il est en 2010 assez facile de transformer des cellules de la peau en cœur !! (voir Figure 4). C'est pourquoi on peut dire que la reprogrammation cellulaire (les iPS) est la pierre philosophale – que recherchaient les alchimistes pour transformer le plomb en or – de la biologie.

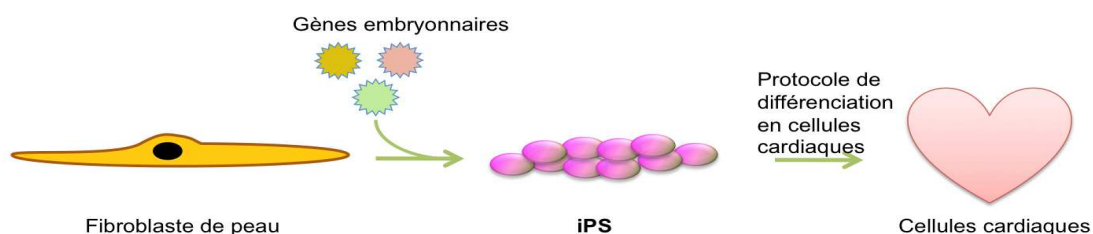


Figure 4 : Comment la technologie des iPS permet de reprogrammer des cellules de la peau (fibroblastes) en iPS, qui à leur tour peuvent être différenciées en cellules cardiaques spontanément battantes *in vitro*: la technologie des iPS est la pierre philosophale de la biologie.

On perçoit alors toute la portée de ces résultats extraordinaires, en particulier en médecine régénérative. La médecine régénérative cherchait une source de cellules jeunes, capables de repeupler et de faire fonctionner à nouveau un organe endommagé par la maladie ou la vieillesse ? Les iPS sont une source théoriquement très séduisante de cellules médicament à cet usage.

Cependant, ces cellules au profil idéal présentent un certain nombre de limites qui expliquent qu'il faudra plusieurs années avant que des iPS ne soient utilisées en thérapeutique :

- Les iPS sont, comme les CSEh, des cellules souches pluripotentes et présentent donc les mêmes inconvénients, dont la propension, du fait de leur prolifération intense, à former des tumeurs non malignes (**tératomes**). Comme pour les CSEh, un tri des cellules différenciées sera impératif avant une injection à des patients.
- Il faudra également bien définir le stade de différenciation que les iPS devront atteindre pour former des cellules médicament efficaces (voir discussion sur ce sujet en 2.1.4). Un problème spécifique aux iPS est lié à leur intégrité génétique. En effet, le protocole de reprogrammation actuel utilise des agents d'origine virale (vecteurs viraux, cf. 4.1.4) qui endommagent le patrimoine génétique des cellules reprogrammées, ce qui pourrait en théorie se traduire par un risque accru de cancer. De nouvelles techniques sont en développement qui ne présenteraient pas ces inconvénients.
 - o - les iPS présentent une certaine mémoire de leur cellule d'origine, ce qui pourrait gêner certains protocoles de différenciation.

Ces réserves n'enlèvent rien aux promesses des iPS, elles rendent compte de la réalité et des obstacles que les médecins doivent affronter avant de pouvoir proposer à leurs patients de nouveaux traitements. Enfin, se développe un autre aspect de la reprogrammation, qui fait l'économie du passage par le stade « embryonnaire ». Par exemple, pour obtenir des cellules cardiaques, il sera peut-être aussi simple de passer directement de cellules de la peau (fibroblastes) à des cellules cardiaques par une reprogrammation « transversale ». Le point commun à tous ces résultats est que dans l'avenir l'on pourra manipuler le destin d'une cellule et transformer n'importe quelle cellule en n'importe quelle autre cellule.

2.3. Avec des cellules immortelles, peut-on repousser la maladie jusqu'à l'immortalité ?

Le concept de médecine régénérative vise à remplacer des cellules endommagées, âgées ou disparues par de jeunes et vigoureuses nouvelles cellules : une véritable cure de jouvence ! Vous avez également vu que la reprogrammation permet de ramener une cellule différenciée, quelque soit son âge, vers le stade le plus infantile qui soit : le stade « embryonnaire ». Ces deux concepts montrent que dans l'avenir, lorsque tous les détails techniques de ces technologies en plein développement seront maîtrisés, on pourra non seulement soigner des pathologies graves touchant des patients jeunes, mais théoriquement aussi repousser les effets de l'âge et soigner au fur et à mesure les très nombreuses maladies aujourd'hui incurables se développant avec les années.

Ces promesses méritent deux réflexions. La première découle du fait que ces technologies vont pouvoir traiter les maladies chroniques liées à l'âge, voire complètement inverser leur cours. Comme la médecine dans son ensemble, mais peut-être de manière encore plus remarquable elle propose une « cure de jouvence », la médecine régénérative repoussera la mort vers des âges de plus en plus avancés. On peut même anticiper que l'application systématique de la médecine régénérative à chaque organe humain pourrait en théorie effacer le délabrement de l'organisme qu'occasionne l'âge et qui mène à la mort. L'immortalité ! De manière intéressante, les progrès de la médecine contribuent ainsi à un débat très ancien autour de ce sujet. Et si l'immortalité n'était peut-être pas si souhaitable que cela ! Le lecteur intéressé pourra alimenter cette discussion par la littérature, en lisant par exemple la fable de Jorge Borges sur ce sujet³.

Mais cette première réflexion en appelle une autre. La seconde réflexion est un appel à la modération sur les espoirs soulevés par ces nouvelles technologies. Non pas que les chapitres précédents soient des conjectures improbables : au contraire, ce qui a été évoqué ci-dessus est certainement en deçà du futur médical. Mais la vitesse de transposition des promesses théoriques, même étayées par des résultats réels, en applications médicales prendra des années, et pour certaines applications des dizaines d'années. Quelle pathologie bénéficiera prioritairement d'une application basée sur des CSEh ou des iPS ? Nul ne le sait à ce jour. L'infarctus du myocarde ? Le diabète sucré ? Les lésions de la moelle épinière ? Il est important de

³ Jorge Luis Borges, L'immortel (L'Aleph, Gallimard, Collection Imaginaire, 1977)

retenir qu'il faut raison garder et savoir que le passage des promesses théoriques aux progrès réels s'établira dans une échelle de temps qui n'est pas forcément celle d'un patient nécessitant de tels traitements et nourrissant, hélas, les espoirs les plus vifs. L'immortalité, et plus simplement le traitement de nombreuses pathologies sévères, resteront encore longtemps hors de portée des moyens médicaux.

2.4. La communication entre scientifiques, média et patients : enthousiasmes et malentendus

La recherche scientifique et médicale est un microcosme de spécialistes, utilisant un langage de spécialiste qui est difficilement compréhensible par les néophytes. Or c'est la recherche d'aujourd'hui qui prépare les traitements de demain. Il est donc essentiel que les chercheurs puissent communiquer avec le public : (i) pour expliquer les progrès importants qui préludent de nouveaux traitements et qui susciteront légitimement de nouveaux espoirs ; (ii) montrer que le travail avance et que les chercheurs trouvent ... pour obtenir de nouveaux financements afin de poursuivre leur travail de recherche !

Il est donc tout à fait légitime et nécessaire que les scientifiques communiquent et transposent en langage intelligible leurs découvertes, et anticipent la portée et les promesses que soulèvent ces progrès. Bien souvent, les retombées les plus spectaculaires et les plus révolutionnaires sont mises en avant. Parfois l'annonce de la découverte est faite selon un plan de communication digne des grandes multinationales ! Mais une confusion entre le discours des chercheurs et ce qu'entend le public existe, et cette confusion vient du délai qui va inéluctablement séparer une découverte effectuée en laboratoire et le moment où ces résultats se concrétiseront en traitements efficaces et sûrs. C'est précisément la source d'un malentendu entre les chercheurs et les patients. Le dialogue et le partenariat mis en place entre l'Inserm et les associations de malades représente de ce point de vue un nouvel espace pour une information complète et critique sur les avancées récentes de la recherche.

Une exception notable à cette réflexion est la recherche clinique, dont les résultats concernent des essais de nouveaux traitements sur des patients: dans ces cas là le succès vaut mise sur le marché du nouveau traitement dans les plus brefs délais, parfois même avant la fin de l'essai en cas d'efficacité significative et en l'absence de traitement alternatif.

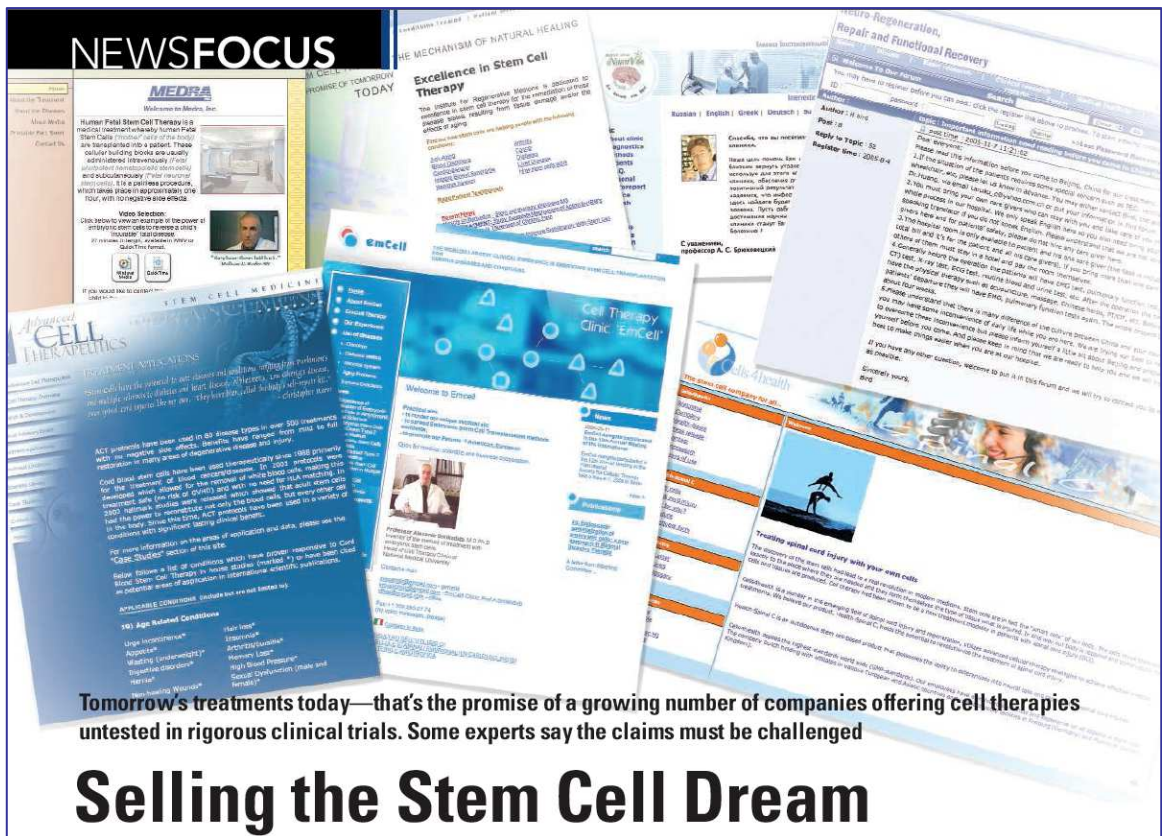


Figure 5 Dénonciation dans la revue américaine **Science** des cliniques vendant des thérapies à base de cellules souches et vantant leur mérite sur internet : « Vendre le rêve des cellules souches ». *Science* 2006 vol. 313 (5784) pp. 160-3

2.5. Abuser de l'espoir des patients

C'est, hélas, sur le long chemin entre découverte et application fondée sur des preuves que s'est développée une nébuleuse d'escrocs vendant des traitements inutiles voire dangereux à prix d'or. Cette pratique a toujours existé en médecine, depuis la poudre de perlimpinpin, mais se transforme en phénomène d'une ampleur sans précédent dans le domaine de la médecine régénérative. Ampleur des prix des traitements (plusieurs milliers de dollars pour certains), ampleur des dangers encourus par les patients, ampleur du nombre des cliniques se livrant à ces pratiques dans le monde (environ 200 aujourd'hui, dont 100 dans l'est asiatique). Dans tous ces cas, des médecins sans scrupules proposent des traitements à bases de cellules : il s'agit bien de thérapie cellulaire pour une médecine régénérative. On vous indique que l'injection est à base de cellules soit du patient (cellules du sang, de la moelle osseuse, etc.) ou bien des cellules d'autrui (parfois même des cellules fœtales issues de fœtus après avortement) et que ces cellules vont soigner votre maladie. Toutes sortes de maladies : le catalogue est complet et couvre toutes les maladies aujourd'hui incurables par la médecine « classique » ! : diabète, sclérose en

plaque, paraplégie, maladies du cerveau, du cœur, etc. Sur le site internet de ces cliniques, de nombreux témoignages démontrent l'efficacité des traitements. Ces traitements ne sont basés sur aucuns résultats scientifiquement contrôlés, et ne permettent pas d'apporter la preuve qu'un bénéfice quelconque puisse en être tiré. Pire, selon les cliniques, les cellules injectées sont d'origine diverse et parfois douteuse. Dans la grande majorité des cas, ces cliniques s'implantent dans des pays dont l'encadrement sanitaire des nouveaux traitements est inexistant (voir discussion sur le rôle protecteur de la réglementation en 2.6). Elles génèrent une forme de tourisme médical, attirant des patients gravement malades, crédules et argentés, vivant dans des pays où ces pratiques sont interdites. Ils confient leur santé et acceptent des traitements développés dans des pays où la réglementation demeure moins contraignante, voire inexistante. Ces dérives croissantes ont fait l'objet d'une dénonciation par la société internationale de recherche sur les cellules souches (ISSCR) qui fournit des recommandations aux gouvernements quant à l'encadrement des nouveaux traitements n'ayant pas fait la preuve de leur efficacité et aux patients tentés de consulter les sites web de ces cliniques miraculeuses^{4,5}.

Malheureusement ces pratiques ne sont pas sans danger, comme le montrent plusieurs publications récentes dont une rapportant l'apparition d'une tumeur cérébrale chez un jeune homme atteint d'une maladie génétique à qui l'on avait injecté dans le cerveau des cellules souches nerveuses issues de fœtus dans une clinique à Moscou⁶. Ces cellules avaient poursuivi leur prolifération après l'injection et entraîné la formation d'une tumeur 4 ans plus tard !

Une autre forme d'abus est la prolifération de sociétés proposant de conserver par exemple les dents de lait ou encore les cellules trouvées dans les menstruations. Ces échantillons contiennent en effet de nombreuses cellules souches dont le potentiel thérapeutique n'est pas encore connu. Mais ces sociétés prêchent la prudence et conseillent la conservation de ces cellules pour un éventuel futur. La réalité est que le corps humain contient beaucoup de cellules souches, y compris à un âge avancé, et qu'il est peu probable que ces cellules des dents de lait ou des menstruations aient un potentiel supérieur aux cellules du patient le jour où celui-ci

⁴ <http://www.isscr.org/public/index.htm> (site de l'ISSCR, en anglais)

⁵ <http://www.sciencesetavenir.fr/magazine/evenement/093995/tourisme-cellulaire-a-bangkok.html>

⁶ Amariglio N et al. PLoS Med. 2009 Feb 17;6(2):e1000029. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. (Article en anglais, librement accessible sur le lien suivant : <http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1000029>)

tombe malade. Les conserver à grands frais avant toute preuve par un essai clinique contrôlé de leur efficacité est donc un abus de crédulité.

2.6. Réglementation en thérapie cellulaire et génique : le difficile équilibre de la balance bénéfice/risque !

Les dérives que nous venons de commenter ci-dessus doivent être combattues. C'est le rôle des réglementations autour de la thérapie cellulaire que de contrôler les pratiques des hôpitaux et des cliniques dans ce domaine. **En France, la pratique de la thérapie cellulaire est encadrée par l'Afssaps, aux Etats-Unis par la FDA.** Le but de cet encadrement n'est pas de décourager les nouveaux traitements, bien au contraire. Il s'agit de (i) s'assurer que les traitements sont donnés dans les règles de l'art, et que lorsqu'un traitement est nouveau, (ii) qu'ils soient testés de manière à ce que l'on prenne des risques raisonnables par rapport à la gravité de la maladie que l'on souhaite traiter, (iii) que l'on ait des arguments convaincants pour prédire un effet bénéfique du nouveau traitement, et que (iv) les résultats de ces tests puissent servir à tirer une conclusion sur l'utilité ou non de ce nouveau traitement. Autrement dit, ce n'est pas parce qu'un patient est atteint d'une maladie incurable que l'on peut lui administrer un traitement qui ne suive pas les bonnes pratiques de la thérapie cellulaire. Cela ne justifie pas non plus qu'on lui fasse encourir un risque trop important sans preuve d'un bénéfice et sans suivi dans le cadre d'un essai clinique. Il est en effet primordial de pouvoir conclure si le traitement a entraîné un bénéfice en suivant tout un groupe de patients ayant tous bénéficié du même traitement. (la comparaison avec un groupe placebo ou traitement fait elle partie des recommandations cliniques des thérapies cellulaires ?)

Alors bien sûr, en France où l'encadrement est strict, des voix s'élèvent pour en dénoncer la rigidité et l'éventuel ralentissement de la recherche. Car l'on exige la preuve, le plus souvent dans des essais sur l'animal, que le traitement ait de bonnes chances de fonctionner et que la procédure soit sans danger. L'on tente également de prouver dans des modèles animaux, que le protocole est reproductible, qu'un suivi des patients après l'essai est effectué, etc. Nous voici finalement au cœur du problème de la recherche clinique, celle qui vise à tester de nouveaux traitements chez l'homme. Par définition, on ne connaît pas encore l'efficacité de ces traitements, ni exactement leurs dangers potentiels. Il faut alors confronter le bénéfice attendu du traitement, la gravité de la maladie ainsi que les traitements alternatifs, aux risques potentiels de ce nouveau traitement : ce délicat exercice

d'équilibre est ce qu'on appelle la balance bénéfique/risque, un jugement difficile à prononcer puisque l'on ne connaît pas encore les résultats de l'essai !

L'encadrement des pratiques de la recherche médicale, en particulier en thérapie cellulaire, s'avère donc comme étant une nécessité pour protéger les patients des profiteurs de leur naïveté et de la précipitation des chercheurs enthousiastes. Mais l'adaptation de la balance bénéfique/risque restera toujours un exercice exposé aux critiques. Le rôle des modèles animaux est dans ce contexte important car il peut souvent donner une idée de l'efficacité potentielle des nouveaux traitements et des risques associés. Mais ces modèles ont leurs limites puisque d'une part, ils ne doivent pas être exigés systématiquement et par ailleurs, malgré tout, l'être humain et l'animal de laboratoire sont par essence différents.