

**LES CELLULES SOUCHES ADULTES ET
LEURS POTENTIALITES D'UTILISATION
EN RECHERCHE ET EN THERAPEUTIQUE**

**COMPARAISON
AVEC LES CELLULES SOUCHES
EMBRYONNAIRES**

Rapport établi à la demande de Roger-Gérard Schwartzberg, ministre de la Recherche, par le groupe de travail présidé par François Gros, secrétaire perpétuel de l'Académie des Sciences

Novembre 2000

SOMMAIRE

I COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL.....	3
II CONSIDERATIONS GENERALES ET RECOMMANDATIONS.....	5
BIBLIOGRAPHIE.....	12
Conclusions.....	15
Recommandations.....	16
III QUESTIONNAIRE	17
IV CONTRIBUTIONS INDIVIDUELLES	18
A CELLULES SOUCHES DU TISSU MEDULLAIRE ET HEMATOPOIETIQUE.....	18
B CELLULES SOUCHES DE LA PEAU ET DE LA CORNEE (KERATINOCYTES, FIBROBLASTES, MELANOCYTES).....	46
C NEURONES FŒTAUX	53
D TISSU MUSCULAIRE SQUELETTIQUE (cellules satellites)	56
E “ CELLULES SOUCHES ” HEPATIQUES (hépatocytes fœtaux et embryonnaires).....	62
F ASPECTS ETHIQUES DE LA RECHERCHE SUR LES CELLULES SOUCHES HUMAINES : MYTHES ET REALITES	65

I COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL

Monsieur Yann BARRANDON
Directeur de Recherche
Département de différenciation épithéliale
Ecole Normale Supérieure

Madame Fabienne BONFILS
Chargée de Mission
Académie des sciences

Madame Colette BREZIN
Chargée de Mission
Académie des sciences

Madame Gillian BUTLER-BROWNE
Directeur de Recherche à l'INSERM
UMR 7000 du CNRS - Cytosquelette et Développement
Hôpital de la Pitié Salpêtrière

Madame Marina CAVAZZANA-CALVO
Praticien hospitalier
Directeur du laboratoire de thérapie cellulaire et génique
INSERM U. 429
Hôpital Necker - Enfants malades

Monsieur Pierre CHARBORD
Directeur de Recherche INSERM
Unité 506 " Ontogénèse de l'hématopoïèse "
Hôpital Paul Brousse

Madame Laure COULOMBEL
Directeur de Recherche INSERM
INSERM U.474
Hôpital Port Royal

Monsieur René FRYDMAN
Professeur
Conseiller du Ministre de la Recherche

Monsieur François GROS
Secrétaire perpétuel
Académie des sciences

Monsieur Louis-Marie HOUEBINE
Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire
INRA

Monsieur Didier MONTARRAS
Chef de Laboratoire
Développement cellulaire
Institut Pasteur

Monsieur Vincent MOULY
Chargé de Recherche au CNRS
UMR 7000 du CNRS -Cytosquelette et Développement
Hôpital de la Pitié Salpêtrière

Monsieur Bruno PEAULT
Directeur de l'Unité INSERM 506
Unité "Ontogenèse des cellules sanguines"
Hôpital Paul Brousse

Monsieur Marc PESCHANSKI
Directeur de l'Unité INSERM U.421
Faculté de Médecine Créteil

Monsieur Christian PINSET
Directeur de Recherche CNRS
Développement cellulaire
Institut Pasteur

Monsieur Alain POMPIDOU
Professeur
Service d'Histologie
Faculté de Médecine Cochin

Monsieur Jean-Paul RENARD
Directeur de Recherche INRA
Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire
INRA

Monsieur Jean ROSA
Professeur
Membre de l'Académie des sciences

Monsieur Marc TARDIEU
Professeur de Pédiatrie
Chargé de Mission
Direction de la Recherche - Département Biologie, Médecine, Santé
Ministère de la Recherche

Madame Anne WEBER
Directeur de Recherche
INSERM E.M.I. 00-20
Hôpital Bécclère

Secrétariat : Nathalie ZAJDMAN

II CONSIDERATIONS GENERALES ET RECOMMANDATIONS

DOCUMENT DE SYNTHÈSE

De nombreux débats ont eu lieu récemment aux Etats-Unis, et en Europe (en Angleterre et en Allemagne) concernant la justification d'une recherche sur les cellules souches embryonnaires humaines, et sur leur utilité thérapeutique pour réparer certains tissus lésés. Le problème s'est amplifié à la suite de l'identification, dans certains tissus animaux adultes, de cellules souches capables d'assurer la régénération de plusieurs organes (phénomène dit de plasticité régénérative). Ces résultats spectaculaires ont conduit à s'interroger sur l'utilité d'une recherche sur les cellules souches embryonnaires, l'argument avancé étant que pourraient exister, chez l'adulte, des cellules capables d'effectuer le même travail. Ce débat a trouvé un écho en France, et le Ministre de la Recherche, Roger-Gérard Schwartzberg, a sollicité l'avis de l'Académie des Sciences à ce sujet. Ce texte résume les conclusions de discussions réunissant des scientifiques de disciplines diverses (*voir composition du groupe de travail et chapitre IV*) concernés par ce problème.

I- Définitions

Le terme de “cellule souche” est utilisé pour désigner une cellule qui, lorsqu'elle est placée dans un environnement tissulaire approprié, est capable de se multiplier (capacité de *prolifération*) et de produire des cellules spécialisées, qui acquièrent une morphologie et une fonction spécifiques du tissu. Ce processus dit *de différenciation*, est (classiquement) irréversible. Une cellule souche n'exprime, quant à elle, aucune spécialisation, on la dit “*indifférenciée*”. Les cellules souches embryonnaires se distinguent des cellules souches adultes par une propriété essentielle : elles ont la possibilité de conduire à la formation de tous les tissus de l'organisme, y compris à celle de la lignée germinale. Les cellules souches adultes sont, pour leur part, déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique, ce qui explique leur hétérogénéité et même si certaines d'entre elles peuvent conduire à la formation ou à la régénération de tissus distincts (multipotence), elles ne sont pas comme leurs homologues embryonnaires, totipotentes.

Il existe 3 types de cellules souches : les cellules souches des tissus adultes, les cellules souches foetales, (parmi lesquelles on peut distinguer des cellules souches somatiques et des cellules germinales dites EG pour *Embryonic Germ cells*), les cellules souches embryonnaires totipotentes, dites ES, pour *Embryonic Stem cells*. A côté de ces trois types de cellules souches, il convient de prendre également en considération les cellules dites “*précurseurs*”.

I-1- Cellules souches adultes

Il nous apparaît que la meilleure façon de définir une cellule souche est sa fonction : une cellule souche tissulaire (dite somatique pour la distinguer des cellules souches germinales) assure l'homéostasie, c'est-à-dire le maintien physiologique d'un organe ou d'un tissu¹, en remplaçant les cellules mortes, que ce soit naturellement ou après une lésion, assurant ainsi la pérennité de la fonction de l'organe pendant la vie de l'individu. Elle remplit cette fonction, d'une part en se multipliant à l'identique (ce qui évite le tarissement du réservoir de cellules souches), d'autre part en se différenciant, acquérant ainsi les caractéristiques du tissu à réparer.

Localisation : Des cellules souches répondant à cette définition et capables de “réparer” les tissus suivants ont été identifiées avec certitude chez l'homme : cellules souches nerveuses [1], hématopoïétiques [2], épidermiques [3], intestinales [4], osseuses [5], pancréatiques, hépato-biliaires, musculaires lisses, musculaires squelettiques [6]. Les cellules souches de trois tissus (sang, peau, intestin) fonctionnent en permanence, pendant la vie, pour renouveler régulièrement l'ensemble des cellules. Hormis celles de l'intestin, les deux autres sont déjà utilisées avec succès en thérapeutique. Quant à celles des autres tissus, elles ne sont activées que lorsque la nécessité d'une réparation se fait sentir.

¹ On parle d'organe pour une structure complexe, comme le foie, le coeur, composée d'un assemblage complexe de cellules spécialisées. Un tissu désigne plus volontiers un ensemble homogène de cellules effectuant une même fonction.

Caractéristiques [7]: Les très nombreux travaux expérimentaux réalisés *in vitro*, ou après transplantation chez l'animal, permettent d'attribuer aux cellules souches adultes les caractéristiques suivantes qui les distinguent des cellules ES :

1. elles ne sont pas considérées comme “*pluripotentes*” et sont généralement “programmées” pour un tissu donné ;
2. elles ne se multiplient pas à l'infini à l'état indifférencié ;
3. elles sont très hétérogènes, compte tenu de la diversité des tissus de l'organisme auxquels elles appartiennent.

Certaines sont “*multipotentes*” : elles peuvent produire des cellules de morphologie et de fonction très différentes, généralement groupées au sein d'un même organe ou tissu. C'est le cas des cellules souches hématopoïétiques, qui produisent toutes les cellules sanguines : globules rouges, blancs et lymphocytes et certaines structures vasculaires. C'est aussi le cas des cellules souches nerveuses, qui produisent les neurones, mais aussi les cellules accessoires du système nerveux (astrocytes, oligodendrocytes). D'autres sont au contraire “*unipotentes*”. Elles ne produisent qu'un seul type de cellules : il en est ainsi, les cellules de l'épiderme qui ne produisent que des kératinocytes. D'autres enfin ont un potentiel intermédiaire : c'est le cas des cellules souches mésenchymateuses, localisées dans la moelle osseuse et qui produisent des cellules osseuses, cartilagineuses, et peut-être musculaires ; ou encore des hépatocytes foetaux, qui produisent des hépatocytes et des cellules biliaires [8].

Capacités de mise en culture et de prolifération : certaines cellules souches adultes se multiplient très efficacement en culture, en conservant intact leur “potentiel” : les cellules souches nerveuses, épidermiques, ou mésenchymateuses, appartiennent à cette catégorie. D'autres n'ont pas ce pouvoir, soit parce qu'elles perdent leur potentiel en se divisant (cellules souches hématopoïétiques), soit qu'elles prolifèrent très peu *in vitro* (cellules souches musculaires). Ce comportement *in vitro* n'est pas prédictif de leur potentiel prolifératif *in vivo* mais est essentiel pour leur manipulation dans un but thérapeutique.

I-2- Cellules souches foetales

Elles sont issues de tissus foetaux à un stade beaucoup plus tardif (5-9 semaines) que le stade de blastocyste embryonnaire et sont isolées à partir de fœtus résultant d'avortements. On distinguera ici deux classes :

Cellules somatiques foetales

Comme les tissus adultes, les tissus foetaux contiennent des cellules souches : deux de ces tissus sont particulièrement importants dans une perspective thérapeutique : (i) les cellules souches des zones germinatives du système nerveux central [9], dans le traitement de certaines pathologies neurodégénératives (maladie de Parkinson ou de Huntington) [10]. En effet, l'allogreffe de neurones foetaux a prouvé son efficacité, tandis que, dans ce cas, l'utilisation de cellules souches nerveuses adultes, (pour autant qu'elles existent), est totalement exclue. (ii) les hépatocytes foetaux qui font l'objet d'une recherche active en vue de transplantation [11].

Cellules germinales (EG) :

Elles sont issues de l'ébauche du tissu germinal de fœtus. Elles sont “*pluripotentes*” comme les cellules ES et ont la même capacité de prolifération que ces dernières. Leur génome est toutefois moins stable que celui des ES, ce qui les rend, pour l'instant, inutilisables dans une perspective thérapeutique, alors qu'elles ouvrent d'importantes perspectives en recherche fondamentale [12].

I-3- Cellules embryonnaires ES pluripotentes

Elles sont issues de la masse interne du “blastocyste”, une structure de 16-40 cellules issues des divisions de l'ovocyte fécondé. Le feuillet externe du blastocyste donnera le placenta. S'il est implanté dans l'utérus, le blastocyste entier peut se développer en un fœtus viable. Au stade de blastocyste (5^{ème} jour de développement), chacune des cellules de la masse interne du blastocyste (ES) est *pluripotente*, voire totipotente puisqu'elle peut produire tous les feuilletts embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme) et les tissus qui en dérivent, ainsi que les cellules germinales. Une fois le blastocyste dissocié, les cellules ES qui en sont extraites ont perdu toute possibilité de se développer ultérieurement en un embryon ; cependant, elles peuvent être cultivées au laboratoire à l'infini tout en conservant leur caractère de “*pluripotence*” et en gardant un génome intact. Il est donc possible d'obtenir des millions de cellules ES *pluripotentes* à partir d'un petit nombre de cellules embryonnaires de blastocyste. Placées dans des conditions de culture précises, ces cellules ont également la capacité de se

différencier en des cellules spécialisées correspondant à tous les tissus de l'organisme (coeur, sang, neurones,.....), les cellules ES pouvant reformer un embryon mais à la stricte condition qu'elles soient réintroduites dans un blastocyste appelé hôte. En aucun cas, elles ne sont capables de générer, à elles seules, un embryon viable.

I- 4- Cellules précurseurs

Quoiqu'on ne puisse pas réellement les placer sur le même plan que les trois types précédents, une mention doit être faite de ce que l'on appelle les cellules " *précurseurs* ". Elles sont issues des divisions des cellules souches mais ont déjà acquis, lors de leur développement, un certain degré de spécialisation et sont physiologiquement fonctionnelles. Bien qu'ayant perdu les caractéristiques des cellules souches proprement dites (elles ne sont plus *multipotentes*, se divisent moins longtemps et moins efficacement) elles peuvent néanmoins être obtenues en grand nombre à partir des cellules souches. Dans certains cas, elles pourraient être utilisées en thérapeutique pour pallier un déficit transitoire d'un organe ou d'un tissu. A cette catégorie appartiennent : les cellules musculaires (dites satellites), les hépatocytes foetaux, les précurseurs hématopoïétiques, les cellules des îlots pancréatiques (*diabète*), certaines neurones.....

II- INTERET THERAPEUTIQUE DES CELLULES SOUCHES ADULTES

Notre comité a été chargé de s'exprimer sur les bénéfices thérapeutiques comparatifs que l'on peut attendre de l'utilisation des cellules souches adultes et des cellules souches embryonnaires.

II-1- Etat actuel des possibilités de réparation d'organes ou de tissus pathologiques, par transplantation ou greffes

Actuellement, deux possibilités existent pour réparer un organe ou un tissu lésé : soit on le remplace en totalité (transplantation d'organe), soit on y implante des cellules capables de pallier, partiellement ou totalement, le dysfonctionnement. Le choix dépend du type d'organe, de sa complexité, de sa capacité de réparation spontanée (à partir de ses propres cellules souches), de l'étendue et de la nature des lésions. Schématiquement, on distingue plusieurs possibilités :

➤ Tissus dont le remplacement peut être assuré par l'utilisation de cellules souches adultes en thérapeutique :

Cellules sanguines : Le receveur malade reçoit, à partir d'un donneur sain, la moelle osseuse² contenant les cellules souches hématopoïétiques qui vont produire, chez le receveur, des cellules sanguines normales pendant la vie de l'individu transplanté [13].

Peau : le patient malade est greffé avec une " *peau artificielle* " obtenue par la multiplication en culture de cellules souches épidermiques prélevées sur une portion de peau saine du malade. Il y a dans ces conditions réparation de l'épiderme et du derme superficiel [14].

Os : Dans les grands dégâts osseux, la réparation osseuse est accélérée par l'implantation de matériaux artificiels et de cellules souches mésenchymateuses, isolées à partir de la moelle osseuse du patient, cellules capables de produire des cellules osseuses (ostéoblastes) [15].

Cerveau : Dans certaines maladies dégénératives (Maladies de Parkinson ou de Huntington) il est actuellement possible d'implanter dans le cerveau malade des neurones foetaux³ et d'améliorer la symptomatologie des malades [16-18].

Pancréas : Pour ce dernier organe aussi, il existe de rares exemples de greffes de pancréas ou de cellules sécrétrices d'insuline dans des diabètes instables [19], mais la généralisation de ce type de greffe n'est pas envisageable actuellement [20].

² Il peut aussi s'agir de sang de cordon, ou de sang périphérique après traitement par des cytokines, ces deux types de suspensions cellulaires contenant aussi des cellules souches hématopoïétiques.

³ Ce cas est particulier dans la mesure où il est totalement exclu d'utiliser des neurones adultes, et des cellules souches nerveuses adultes.

➤ Organes actuellement réparés par transplantation d'un organe sain :

Foie⁴, rein, ou coeur : ces organes au fonctionnement très complexe sont actuellement réparés par la transplantation au receveur malade de tout ou partie d'un organe déjà fonctionnel prélevé chez un donneur sain, vivant (cas du rein) ou décédé. Une telle transplantation obéit à des contraintes strictes et comporte des risques qui en limitent l'application à un nombre très restreint de malades. Le petit nombre de donneurs est un obstacle important au développement de ces greffes et l'obligation de traitements immunosuppresseurs est à considérer.

➤ Organes/tissus ne bénéficiant pas d'une transplantation d'organe ou d'une greffe de cellules souches :

Plusieurs organes sont dans ce cas : muscle, cerveau, intestin (sauf à de très rares exceptions), pancréas.

Les limitations des greffes d'organes évoquées ci-dessus justifient la recherche d'autres sources de cellules "réparatrices". Les données scientifiques suggèrent que cet objectif n'est pas irréaliste, mais une longue étape de recherche fondamentale doit en établir, chez l'homme, la faisabilité. Ces travaux doivent être entrepris de façon urgente, compte tenu de l'impact majeur qu'une utilisation de cellules souches thérapeutiques ou de cellules "précurseurs" pourrait avoir dans le domaine médical. Le succès de stratégies thérapeutiques utilisant des cellules souches hématopoïétiques (greffe de moelle osseuse), des cellules nerveuses foetales (pathologies neurodégénératives), des cellules mésenchymateuses (pathologies osseuses : essais cliniques en cours), ou des cellules souches épidermiques (grands brûlés), sont autant d'arguments plaidant en faveur d'une telle hypothèse. Certaines prédictions suggèrent que 30 à 50% de la population pourrait, dans le futur, bénéficier du développement de ces thérapeutiques.

II-2- Cellules souches adultes : état des travaux actuels - nouvelles données expérimentales et perspectives

➤ Organes ou tissus dans lesquels on a identifié des cellules souches :

Par analogie avec la classification utilisée ci-dessus, il faut distinguer deux catégories de tissus : ceux qui sont renouvelés en permanence par des cellules souches, et ceux qui contiennent des cellules souches "de réserve", qui ne sont pas actives spontanément [21].

- Comme nous l'avons déjà souligné, les cellules de trois organes se renouvellent en permanence pendant la vie : le tissu sanguin, l'épiderme, l'intestin (et dans une moindre mesure : l'os et l'épithélium respiratoire). Ce renouvellement est la preuve physiologique de l'existence de cellules souches actives. Ces cellules souches sont, à l'exception de celles de l'intestin⁵, déjà utilisées en thérapeutique.

- Nombre d'organes ou de tissus adultes contiennent probablement des cellules souches, mais celles-ci sont peu ou pas actives et incapables de réparer efficacement (du moins dans l'état actuel des recherches) une lésion ou un dysfonctionnement de l'organe. C'est ainsi que l'on a décrit des cellules souches adultes dans le foie, le cerveau, le pancréas, la rétine, l'épithélium respiratoire [22], certains vaisseaux [23]. Le foie est un cas particulier car il contient deux types de cellules réparatrices [8] capables de combler une perte tissulaire partielle ^{voir 3}.

Or, jusqu'à maintenant, plusieurs obstacles s'opposaient en effet à l'utilisation expérimentale et thérapeutique des cellules souches adultes :

- Les cellules souches de ces organes sont enfouies dans le tissu, et donc très difficiles d'accès (foie, cerveau, muscle, intestin, pancréas...),
- Elles existent en nombre infime et l'absence de marqueurs spécifiques connus ne permet pas de les purifier,

⁴ Le cas du foie est particulier : il contient deux types de cellules réparatrices : les cellules hépatiques elles-mêmes, qui sont déjà spécialisées, mais ont cette propriété unique de se multiplier si l'on enlève un morceau du foie, et de rétablir la taille normale de l'organe. Mais ceci n'est valable que si les cellules elles-mêmes ne sont pas atteintes par la pathologie, et ne concernent donc pas les maladies hépatiques comme la cirrhose, ou les conséquences d'hépatites. Une seconde catégorie de cellules, les cellules ovales, représentent des "cellules souches" proprement dites, mais sont peu efficaces [8].

⁵ Les cellules souches de l'intestin, insérées très profondément au fond des cryptes intestinales, sont très rares, et de ce fait, peu accessibles.

- On ne connaît pas les conditions permettant de les faire se multiplier *in vitro* (exception faite des cellules souches nerveuses),
- On ne dispose pas de modèles mimant la situation observée chez l'homme pour évaluer leur fonction,
- Dans les maladies avec anomalies génétiques, celles-ci se perpétueraient au cours des divisions si les greffes sont de type autologue,
- Des anomalies de structures de l'ADN (à la suite d'expositions à la lumière, aux toxiques entraînant des erreurs de réplication) seraient maintenues.

➤ Nouvelles données expérimentales sur les cellules souches adultes

Plusieurs observations remarquables issues de la recherche fondamentale ont modifié notre approche expérimentale du problème des cellules souches adultes au cours de ces deux dernières années. Elles auront certainement un grand retentissement en thérapeutique, car elles apportent une réponse possible aux difficultés énoncées ci-dessus. Il convient cependant d'être prudent car toutes ces données proviennent de travaux réalisés chez l'animal, et peu d'entre eux ont été reproduits chez l'homme.

Les observations récentes dont il est fait état ci-après indiquent que des tissus d'accès facile pourraient être en fait des réservoirs de cellules souches réparatrices de plusieurs tissus d'utilisation physiologique aisée. Le résultat le plus spectaculaire concerne la moelle osseuse : elle contient non seulement des cellules souches du tissu sanguin (hématopoïétiques), et du tissu osseux et cartilagineux [24-25] mais aussi des cellules souches qui, implantées dans un muscle squelettique, produiront des cellules musculaires [26-27], des cellules souches du foie [28], et peut-être des cellules souches capables de produire certaines catégories de cellules nerveuses [29]. La moelle osseuse étant facilement accessible chez tout individu, et à tout âge, cette observation peut suggérer que ce tissu serait une source de cellules réparatrices pour nombre de tissus. La réalité de ce phénomène a été établie chez l'animal (souris) et uniquement dans le cas du muscle et du foie, mais son efficacité demeure encore faible. Deux autres tissus adultes, le muscle et le cerveau, contiennent également plusieurs types de cellules souches : le muscle contient des cellules souches hématopoïétiques [30], et certaines régions du cerveau des cellules souches nerveuses aussi capables de différenciation en cellules musculaires [31] ou en cellules sanguines [32]. Ces derniers résultats ne reposent cependant que sur très peu de données et méritent d'être confirmés.

Dans les expériences rapportées ci-dessus, on ignore encore si, dans la moelle osseuse, plusieurs cellules souches distinctes co-existent, ou si une seule cellule souche pourrait se "différencier" pour produire diverses cellules spécialisées. Si tel était le cas, cela signifierait que certaines cellules souches tissulaires ont des propriétés proches de celles de cellules embryonnaires, c'est-à-dire qu'elles sont capables de produire des cellules de plusieurs tissus (phénomène dit de "*plasticité*").

En résumé, les exemples les plus démonstratifs illustrant ces résultats récents sont les suivants :

- La moelle osseuse de souris et de rat adultes contient des cellules capables de réparer le foie [28], le muscle [33], le système nerveux [29,34] et, - ce qui était connu auparavant- le tissu sanguin et l'os [35-36] et peut-être certains vaisseaux,
- les cellules souches nerveuses adultes de souris peuvent produire non seulement des neurones (homme et souris), mais aussi, lorsqu'elles sont dans les conditions adéquates, des cellules musculaires (homme et souris) [31] et sans doute également des cellules sanguines (souris) [32],
- les cellules "mésenchymateuses" présentes dans la moelle osseuse adulte produisent des cellules osseuses et cartilagineuses et peut-être, des cellules nerveuses [5, 29, 34]. Ces données sont validées chez l'homme [25, 37],
- les cellules issues de muscle adulte de souris produisent des cellules musculaires et aussi des cellules sanguines [30, 38].

Il n'est donc pas exclu que l'on puisse, à partir d'un prélèvement de moelle osseuse adulte, démontrer qu'il est possible d'améliorer certaines pathologies touchant des organes tels que le foie, le muscle ou certaines maladies neurodégénératives, pour lesquelles les thérapeutes sont actuellement assez démunis.

Une telle perspective présenterait de nombreux avantages :

- La facilité de prélèvement du tissu (moelle osseuse),
- La possibilité de pouvoir utiliser la moelle osseuse propre au patient comme source de cellules souches réparant le tissu lésé, une situation de greffe autologue particulièrement favorable puisqu'elle éviterait le recours aux donneurs et éliminerait le risque de rejet, ainsi que le recours aux immunosuppresseurs,

- La possibilité de créer des “banques” de cellules souches compatibles, s’il s’avère que les cellules peuvent être amplifiées *in vitro* au laboratoire,
- Peut-être, à terme, l’espoir de stimuler, directement chez le malade, la migration de ces cellules souches vers le tissu lésé, et d’orienter leur différenciation dans une voie tissulaire spécifique.

➤ Conditions d’utilisation des cellules souches adultes en thérapeutique humaine :

A l’exception des cellules souches de la peau et du tissu hématopoïétique déjà utilisés avec succès en thérapeutique réparatrice, l’utilisation d’autres cellules souches tissulaires adultes, pour séduisante qu’elle soit compte tenu des données évoquées ci-dessus, est encore purement spéculative et ne repose que sur les résultats décrits dans une dizaine d’articles de recherche fondamentale publiés au cours des années 1999-2000 et chez des modèles animaux [28, 30-32, 39]. La rareté des données actuellement publiées chez l’homme, si elle écarte l’hypothèse d’une utilisation à court-terme (< 5 ans) de cellules souches adultes en thérapeutique, rend indispensable en revanche leur étude sur un plan fondamental qui seule documentera leur potentiel intérêt thérapeutique.

De ce qui précède, il nous apparaît que les principaux objectifs à atteindre dans une optique thérapeutique sont de deux ordres :

- *Sur un plan fondamental* : il est essentiel

- d’obtenir la preuve que chez l’homme comme chez l’animal, la moelle osseuse, et éventuellement d’autres tissus adultes (dont le muscle) contiennent plusieurs types de cellules souches tissulaires,
- de déterminer le degré de “*pluripotence*” de cellules souches adultes, musculaires, nerveuses, ou hématopoïétiques: sont-elles capables de s’orienter vers la fabrication de plusieurs tissus, au choix de l’expérimentateur ?

- *Dans l’hypothèse d’une application pratique future*, il est essentiel de déterminer les conditions d’obtention d’un nombre de cellules souches adultes (ou de cellules spécialisées obtenues en culture à partir de la différenciation de cellules souches) suffisant et compatible avec la réparation tissulaire *in vivo* chez le patient. Cela implique les opérations suivantes :

- définir les facteurs nutritifs dont ces cellules ont besoin pour se multiplier, tout en gardant intacte leur capacité de produire des cellules spécialisées réparant le tissu *in vivo* et caractériser la nature des gènes permettant cette multiplication importante,
- identifier les signaux spécifiques d’un environnement tissulaire donné qui dictent la différenciation des cellules souches pour former ce tissu, et caractériser la nature des gènes activés lors de cette induction [39],
- évaluer la fonction des cellules ainsi traitées hors de l’organisme, il faut définir des modèles animaux aussi proches que possibles de la physiologie humaine, et y vérifier la réalité de l’utilisation de cellules souches adultes.

Plusieurs obstacles compliquent l’étude des cellules souches tissulaires adultes en l’état actuel de nos connaissances : leur rareté, l’absence de marqueurs connus permettant de les purifier, notre ignorance des conditions de leur multiplication et de leur capacité à intégrer et à exprimer des gènes dans une perspective de thérapie génique. C’est dans ce contexte de recherche fondamentale que l’utilisation de cellules embryonnaires revêt toute son importance.

III- Utilisation de cellules souches embryonnaires humaines

III-1- Qu’apporte l’utilisation de cellules embryonnaires ?

La “*pluripotence*” intrinsèque des cellules souches embryonnaires leur confère un avantage unique pour analyser les signaux qui “dictent” à une cellule souche sa spécification, et pour caractériser les gènes qui sont activés en réponse à ces signaux. Cette propriété a été exploitée depuis les années 1980 chez la souris. Chez cette espèce en effet, les cellules souches embryonnaires (ES) sont particulièrement faciles à cultiver. Leur utilisation a permis des progrès considérables dans notre connaissance des gènes clés contrôlant le développement et le fonctionnement des différents tissus et organes [40].

Parmi les autres avantages des cellules ES murines, citons :

- *Leur capacité de prolifération* quasi-illimitée au laboratoire (sans qu'elles soient capables pour autant de reformer un embryon viable). Ceci permet l'accumulation d'un nombre très élevé de cellules, et l'isolement de lignées permanentes ayant les mêmes caractéristiques que les cellules primaires. Les travaux de recherche peuvent être réalisés à partir de ces lignées.
- *Les cellules ES conservent un génotype et un caryotype normaux*. Malgré leur taux de prolifération, elles n'accumulent pas de mutations.
- *Elles sont pures*, et donc leur potentiel est identique.
- *Elles se prêtent à une grande facilité d'analyse et de modification de leur génome* : on peut y insérer ou "déléter" des gènes dont on postule l'importance pour la réalisation d'un programme tissulaire donné, ce qui permet d'analyser (vérifier) les conséquences fonctionnelles de ces perturbations.
- *Le déclenchement de leur différenciation peut s'opérer*, à la demande, dans tel ou tel tissu, grâce à l'ajout de molécules régulatrices⁶ [41-44].
- Les cellules embryonnaires constituent certainement *une source privilégiée de signaux inducteurs* puisque c'est au stade embryonnaire que se décide l'organogenèse, c'est-à-dire la mise en place des différents organes /tissus qui constitueront l'organisme adulte. Ces signaux pourraient être (chimiquement) identifiés et "purifiés" à partir de ces cellules ES ou de leur descendance, puis utilisés pour la spécification de cellules souches tissulaires adultes [39].

Néanmoins, même si le fonctionnement de certains tissus est globalement très similaire chez l'homme et chez la souris, il est cependant difficile d'extrapoler à l'homme les conclusions tirées de l'étude des cellules souches embryonnaires de la souris. En effet, à un échelon de régulation plus fin, les molécules régulatrices divergent, et d'autres critères, comme la taille de l'animal, sa durée de vie, rendent souvent le modèle souris inexploitable dans une perspective thérapeutique.

III-2- Pourquoi le développement de travaux fondamentaux sur les cellules embryonnaires humaines s'avère-t-il urgent ?

D'un point de vue expérimental, l'exploration *in vitro* des cellules ES murines est très aisée [45] mais, comme nous venons de le dire, il est probable que l'avantage ainsi obtenu soit propre à cette espèce. En effet, les rares équipes ayant tenté de cultiver des cellules embryonnaires humaines (ou celles de primates), se sont heurtées à des difficultés [46]. Il ressort de leurs études que les conditions de culture et de différenciation des cellules ES murines ne sont pas transposables directement à l'analyse des cellules ES humaines ou de primates (singe). Un long travail de recherche sera donc nécessaire pour mettre au point les conditions de culture des cellules ES humaines avant qu'on ne puisse réellement en exploiter les propriétés. Quant à leur utilisation en thérapeutique, elle n'est pas d'actualité avant que cette étape de recherche fondamentale n'ait été rigoureusement remplie et que ne soit résolu le problème de la compatibilité immunologique entre les cellules ES et le receveur.

Nous avons vu précédemment les problèmes que pose l'étude des cellules souches adultes. L'urgence, si l'on ne veut pas prendre un retard considérable dans l'exploitation d'un domaine de recherche qui peut révolutionner l'abord thérapeutique de certaines pathologies, est de disposer d'un modèle expérimental techniquement exploitable permettant un travail de recherche efficace. Or un tel modèle (animal) n'est actuellement pas disponible. Dans cette optique, il est essentiel de pouvoir utiliser les cellules embryonnaires humaines. L'utilisation, en parallèle, de cellules embryonnaires de gros animaux (singe), sans sous-estimer que les travaux sur les primates se heurtent partout dans le monde à des oppositions bien organisées (voir le rapport de l'Académie des sciences sur l'expérimentation animale), peut s'avérer être une approche complémentaire d'une très grande utilité [47-48], d'autant qu'existent chez les primates des modèles de pathologies proches des maladies humaines.

⁶ Les cellules ES sont capables de se différencier dans d'innombrables voies, mais insistons ici sur leur capacité de différenciation dans les voies nerveuses, cardiaques, pancréatiques, qui pourraient avoir une implication thérapeutique importante.

BIBLIOGRAPHIE

1. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287:1433-8.
2. Robin C, Pflumio F, Vainchenker W, Coulombel L. Lympho-myeloid totipotent stem cells are present in fresh human cord blood and in the marrow of non-obese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice transplanted with human CD34+ cord blood cells. *J Exp Med* 1999; 189: 1601-1610.
3. Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 1994; 76:1063-73.
4. Booth C, Potten C. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 2000; 105:1493-9.
5. Bianco P, Gehron R. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000; 105:1663-8.
6. Renault V, Piron-Hamelin G, Forestier C, et al. Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp Gerontol.* 2000; 35:711-719.
7. Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 1999; 96:737-49.
8. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276:60-6.
9. Vescovi AL, Parati EA, Gritti A, et al. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* 1999; 156:71-83.
10. Dunnett S, Bjorklund A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 1999; 399:A32-9.
11. Andreoletti M, Pages JC, Mahieu D, et al. Preclinical studies for cell transplantation: isolation of primate fetal hepatocytes, their cryopreservation, and efficient retroviral transduction [published erratum appears in *Hum Gene Ther* 1997 May 20;8(8):1024]. *Hum Gene Ther* 1997; 8:267-74.
12. Thomson J, Odorico J. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends Biotechnol* 2000; 18:53-7.
13. Rocha V, Chastang C, Souillet G, et al. Related cord blood transplants: the Eurocord experience from 78 transplants. Eurocord Transplant group. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21:S59-62.
14. Berthod F, Damour O. In vitro reconstructed skin models for wound coverage in deep burns. *Br J Dermatol* 1997:809-16.
15. Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop* 1998:S247-56.
16. Svendsen CN, Caldwell MA, Ostenfeld T. Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. *Brain Pathol* 1999; 9:499-513.
17. Bachoud-Levi A, Bourdet C, Brugieres P, et al. Safety and tolerability assessment of intrastriatal neural allografts in five patients with Huntington's disease. *Exp Neurol* 2000; 161:194-202.
18. Levivier M, Dethy S, Rodesch F, et al. Intracerebral transplantation of fetal ventral mesencephalon for patients with advanced Parkinson's disease. Methodology and 6-month to 1-year follow-up in 3 patients. *Stereotact Funct Neurosurg* 1997; 69:99-111.
19. Shapiro A, Lakey J, Ryan E, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343:230-8.
20. Robertson P. successful islet transplantation for patients with diabetes-fact or fantasy? *N Engl J Med* 2000; 343:289.
21. Fuchs E, Segre J. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000; 100:143-55.
22. Delplanque A, Coraux C, Tirouvanziam R, et al. Epithelial stem cell-mediated development of the human respiratory mucosa in SCID mice. *J Cell Sci* 2000:767-78.
23. Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000; 106:571-8.
24. Prockop D. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276:71-4.
25. Horwitz E, Prockop D, Fitzpatrick L, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999; 5:309-13.
26. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland C, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401:390-4.
27. Ferrari G, Cusella-DeAngelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279:1528-1530.
28. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284:1168-70.

29. Woodbury D, Schwarz E, Prockop D, Black I. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61:364-70.
30. Jackson K, Mi T, Goodell M. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:14482-6.
31. Galli R, Borello U, Gritti A, et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neuroscience* 2000; 3:986-91.
32. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo [see comments]. *Science* 1999; 283:534-7.
33. Cossu G, Malvilio F. Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? *J Clin Inv* 2000; 105:1669-1674.
34. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:10711-10716.
35. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Ostogenesis differentiation of purified culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997; 64:295-312.
36. Dennis J, Merriam A, Awadallah A, Yoo J, Johnstone B, Caplan A. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 1999; 14:700-9.
37. Pittenger M, Mackay A, Beck S, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.
38. Seale P, Sabourin L, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki M. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000; 102:777-86.
39. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, et al. Generalized potential of adult neural stem cells [see comments]. *Science* 2000; 288:1660-3.
40. Gardner R. Contributions of blastocyst micromanipulation to the study of mammalian development. *Bioessays* 1998; 20:168-80.
41. Lee S, Lumelsky N, Studer L, Auerbach J, McKay R. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18:675-9.
42. Brustle O, Jones K, Learish R, et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 1999; 285:754-6.
43. Kolosov E, Fleischmann B, Liu Q, et al. Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein. *J Cell Biol* 1998; 143:2045-56.
44. Wiles M, Keller G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 1991:259-67.
45. Gardner R. The origin and efficient derivation of embryonic stem (ES) cells in the mouse. *Pathol Biol* 1998; 46:676-7.
46. Reubinoff B, Pera M, Fong C, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000; 18:399-404.
47. Thomson J, Marshall V. Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol* 1998; 38:133-65.
48. Thomson J, Kalishman J, Golos T, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:7844-8.

Bibliographie générale scientifique, éthique et politique

Avis 64 du CCNE

Conseil d'Etat: Les lois de bioéthique :cinq ans après

OPECST: Le clonage...

Colloque de Bordeaux 22 23 juin 2000

Académie Nationale de Médecine:cel souches embryonnaires...

Ethical aspects of human stem cells research and uses: Meeting of the European group on Ethics in Science and New Technologies (EGE). 26 juin 2000, Bruxelles.

Déclaration du President de la Commission européenne sur le clonage thérapeutique 04/08/2000

Ethical issues in human stem cell research :National Bioethics Advisory Commission (E.U)

Stem cell research and applications.Monitoring the frontiers of biomedical research. AAAS

National Institute of Health Guidelines for research using pluripotent stem cells, August 23 2000.

TherapeuticCloning: A submission by the the Royal society to the Chief Medical Officer's expert group._the Royal Society, Fev 2000

Aspects éthiques de la recherche sur les cellules souches humaines et leur utilisation,,14 nov 2000. Avis du groupe européen d'éthique des sciences et des nouvelles technologies auprès de la commission européenne.

CB/20.11.00

Conclusions

La découverte chez l'animal adulte de cellules souches pouvant contribuer, de façon transitoire ou permanente, à la réparation de tissus comme ceux du foie, du muscle, du pancréas et du cerveau est une avancée majeure. Si ces données étaient transposables à l'homme, elles pourraient inaugurer un changement considérable dans notre attitude thérapeutique pour nombre de pathologies face auxquelles nous sommes actuellement démunis compte tenu des limites ou des impossibilités d'une transplantation d'organe. Il n'est donc guère surprenant que des moyens importants aient été mis en oeuvre dans plusieurs pays, afin de déterminer rapidement, dans des programmes de recherche fondamentale, la portée médicale de ces observations, faites en grande partie chez l'animal et dont toutes n'ont pas été confirmées chez l'homme. Cette approche fondamentale, urgente et essentielle, doit être, pensons-nous, financée en priorité.

D'un point de vue thérapeutique, et exception faite des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et de la peau déjà utilisées avec succès, deux types de pathologies devraient rapidement bénéficier des données fondamentales récentes : les maladies neurodégénératives et les pathologies ostéoarticulaires. La première catégorie bénéficie déjà de la greffe de neurones foetaux, et les conditions d'obtention de cellules nerveuses spécialisées, à partir de cellules nerveuses foetales, et à partir de cellules ES murines, sont déjà en partie définies. La seconde catégorie s'impose parce que les cellules mésenchymateuses isolées de la moelle osseuse sont déjà un adjuvant important de certains actes de chirurgie réparatrice osseuse. D'autres sont encore au stade de la recherche, mais pourraient avoir dans l'avenir une importance considérable, par exemple les cellules des îlots pancréatiques dans l'amélioration de certains cas de diabète insulino-dépendant, les cardiomyocytes dans certaines pathologies cardiaques, les cellules musculaires squelettiques pour les dysfonctionnements musculaires ou encore les cellules souches hépatiques.

Deux axes de recherche devraient selon nous être privilégiés :

1. L'analyse des cellules souches tissulaires humaines. Dans cette approche, les chercheurs vont être confrontés à plusieurs obstacles : leur rareté, leur accès difficile, les difficultés qui s'attachent à leur purification et à leur culture. Pour accélérer les progrès, deux autres modèles doivent être exploités en parallèle ;
2. L'utilisation des cellules souches adultes et embryonnaires des gros animaux, qui constituent un modèle plus proche de la physiologie humaine que les souris, mais qui présentent l'inconvénient majeur de n'être disponibles que pour un petit nombre d'équipes, en raison de leur coût ;

En outre, si le contexte législatif le permet, il serait hautement souhaitable d'avoir recours au modèle des cellules souches embryonnaires humaines multipotentes, dont l'on sait à travers les données de la littérature, notamment américaine, que la manipulation est beaucoup plus aisée que celle des cellules souches adultes. L'utilisation de ces cellules est aussi très pertinente sur un plan scientifique : en effet, selon toute vraisemblance, les mécanismes fondamentaux qui contrôlent la programmation et la spécification d'une cellule souche multipotente embryonnaire sont proches de ceux qui contrôlent les cellules souches adultes. Les données acquises à partir de ce modèle de cellules embryonnaires humaines pourraient d'ailleurs s'avérer très utiles par la suite pour l'analyse des cellules souches adultes.

L'évolution des travaux fondamentaux de ces dernières années dans le domaine des cellules souches ouvre donc des perspectives extrêmement importantes et on se trouve peut-être au seuil d'une révolution dans la façon de concevoir notre approche thérapeutique de pathologies fréquentes, lesquelles posent de réels problèmes de santé publique. Ces perspectives doivent être validées par des travaux de recherche fondamentale qui sont en cours et dont l'accélération est prévisible dans les 5 années qui viennent. Les décisions qui seront prises aujourd'hui de faciliter ou non ces études fondamentales détermineront en grande partie non seulement le niveau de compétitivité internationale de notre recherche, mais aussi l'évolution de notre médecine.

Recommandations

V-1- Travaux de recherche fondamentale sur les cellules souches adultes humaines

Objectif : établir la faisabilité d'une utilisation thérapeutique de cellules souches tissulaires adultes.

- Caractérisation des différents types de cellules souches somatiques adultes humaines,
- Etude de leur degré de plasticité tissulaire,
- Identification des signaux environnementaux inducteurs,
- Amélioration de leur purification (définition de marqueurs spécifiques), établissement des conditions de leur multiplication *in vitro*.
- Analyse de leur localisation, et de la possibilité de leur "mobilisation" *in vivo* dans des contextes définis de stimulation

V-2- Travaux de recherche thérapeutique utilisant des cellules souches adultes

Encourager les stratégies thérapeutiques existantes ou naissantes utilisant des cellules souches adultes : cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse, cellules de peau (grands brûlés), cellules musculaires (pathologie cardiaque), cellules β du pancréas (diabète).

V-3- Travaux de recherche fondamentale sur les cellules humaines foetales

- Amélioration des conditions actuelles d'utilisation thérapeutique de cellules souches provenant de tissus foetaux humains issus d'IVG.
- Analyse du potentiel des cellules souches de type EG.

V-4- Travaux de recherche fondamentale sur les cellules souches embryonnaires humaines (dans un cadre éthique à définir)

Il ressort des considérations développées dans ce document qu'il serait hautement nécessaire d'autoriser, dans le cadre du respect de la réglementation et de l'éthique, les travaux de recherche fondamentale portant sur l'analyse cellulaire et moléculaire du développement somatique de cellules embryonnaires issues de blastocystes humains. A cet égard, il faut probablement distinguer la réglementation concernant :

- la manipulation de cellules de blastocystes primaires pour l'obtention des conditions de culture requises pour l'établissement de lignées de cellules ES humaines. La restriction à quelques laboratoires de la possibilité de manipuler ces prélèvements peut être envisagée si une pression sociale justifiait l'application de contraintes,
- la manipulation des lignées de cellules dérivées de blastocystes humains une fois ces lignées établies,
- l'utilisation respective dans les laboratoires publics et les entreprises privées de lignées de cellules ES et de blastocystes primaires.

Trois grands axes de recherche seraient à encourager ici :

- définition des conditions d'amplification, de différenciation et des conditions de modifications génétiques des cellules souches embryonnaires humaines,
- analyse des signaux et des gènes spécifiant la différenciation des cellules pluripotentes dans une lignée tissulaire,
- développement de méthodes de clonage thérapeutique (transfert nucléaire) qui doit faire partie des objectifs expérimentaux des prochaines années. En effet, si se pose un jour le problème d'une utilisation thérapeutique des cellules ES, celui de la compatibilité immunologique entre le receveur malade et les cellules ES se posera et devra être résolu.

V-5- Travaux de recherche fondamentale utilisant des modèles de gros animaux

Travaux de recherche sur les cellules souches embryonnaires (cellules ES, EG) et adultes dans des modèles de gros animaux (singe, porc, mouton).

III QUESTIONNAIRE

Ce questionnaire a été établi par le groupe de travail et a servi de base de réflexion à chacune des équipes ayant participé à ce rapport

1. Type de modèle cellulaire utilisé et espèce (humaine et/ou animale)
2. Quels potentiels de différenciation peut-on obtenir : comparaison cellules souches adultes vs. cellules souches embryonnaires dans votre modèle d'étude ?
3. Capacité de mise en culture des cellules souches adultes vs. cellules souches embryonnaires
4. Besoins nutritionnels en cultures *in vitro* (type de milieu, facteurs de croissance, etc.)
5. Quelles propriétés (morphologiques, cytologiques et/ou moléculaires) s'attachent à l'état de division et de différenciation des cellules de votre modèle d'étude ?
6. Destin de ces cellules lors d'un transfert *in vivo* chez l'embryon ou chez l'adulte
7. Degré de plasticité (trans-différenciation)
8. Voies d'accès au tissu-cible chez qui l'on vise à produire un effet régénérateur
9. Utilité des cellules souches mises en œuvre dans votre modèle en thérapie cellulaire et en thérapie génique ; comparaison cellules adultes vs. cellules embryonnaires – Type(s) de pathologie(s) humaine(s) susceptible(s) d'en bénéficier
10. Clonage thérapeutique (potentiel ou effectif)
11. Autres remarques ou spécifications

IV CONTRIBUTIONS INDIVIDUELLES

A CELLULES SOUCHES DU TISSU MEDULLAIRE ET HEMATOPOIETIQUE

I- FILIATIONS CELLULAIRES INATTENDUES ENTRE SANG ET AUTRES TISSUS DE L'ORGANISME

Bruno Péault

II- CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES ET MESENCHYMATEUSES

Laure Coulombel

III- CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES ET DEFICITS IMMUNITAIRES

Marina Cavazzana-Calvo

IV- CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES

Pierre Charbord

V- CELLULES SOUCHES ANGIO-HEMOBLASTIQUES (et épithélium respiratoire)

Bruno Péault

I
FILIATIONS CELLULAIRES INATTENDUES
ENTRE SANG ET AUTRES TISSUS DE L'ORGANISME : des
cellules souches totipotentes persistent-elles chez l'adulte ?

Bruno Péault
Directeur de l'Unité INSERM 506
Unité "Ontogenèse des cellules sanguines"
Hôpital Paul Brousse

Inserm Unité 506
Bâtiment Lavoisier
Hôpital Paul Brousse
12, av. Paul Vaillant-Couturier
94807 Villejuif Cedex
Tél. : 01 45 59 52 63 - Fax : 01 45 59 52 68
E-mail : U506@infobiogen.fr

Hématologie, 2000 (sous presse)

Les barrières existant, en termes de filiations cellulaires, entre les différents tissus de l'organisme adulte sont peut-être moins étanches qu'on ne le croyait jusqu'à présent. La moelle osseuse hématopoïétique contient les cellules souches de différents tissus mésodermiques comme l'os, le cartilage et même le muscle strié. Inversement des cellules musculaires peuvent restaurer l'hématopoïèse de souris irradiées. Il est encore plus étonnant qu'aient été décrites une régénération hépatocytaire médiée par des cellules de la moelle osseuse, et des cellules souches neurales à multiples potentialités ecto-, endo- et mésodermiques. Il demeure à confirmer que de tels "sauts ontogénétiques" entre les dérivés des feuilletts embryonnaires fondamentaux sont possibles et à en préciser les mécanismes avant de déterminer si l'organisme développé contient encore des cellules souches totipotentes, ou des cellules différenciées douées de capacités de reprogrammation insoupçonnées.

Mots-clés :

Hématopoïèse ; ontogénèse; cellule souche ; muscle ; foie ; système nerveux ; vaisseau sanguin ; hémangioblaste.

Unexpected cell lineage relationships between blood and other tissues : are totipotent stem cells still present in the adult organism ?

The idea that fixed boundaries separate tissue lineages in the adult organism has been recently challenged. The bone marrow contains stem cells for a variety of mesodermal derivatives like bone, cartilage, adipocytes and even striated muscle. Conversely, muscle cells can restore hematopoiesis when injected into irradiated mice. The wall of some blood vessels appears to contain mesodermal stem cells endowed with such a broad developmental potential.

More surprisingly, bone marrow has been reported to contribute hepatocytes in conditioned animals, while neural stem cells became endowed with multiple ecto-, meso- and endodermal potentialities when introduced into early embryos. Such developmental "jumps" must be confirmed and further documented in order to determine whether the developed organism contains much plastic cells capable of transdifferentiation or ancestral, uncommitted ES-like cells.

L'existence de cellules souches à l'origine de toutes les cellules sanguines a été très tôt suggérée par l'observation du développement embryonnaire, puis démontrée chez l'animal adulte dont la moelle osseuse peut pallier chez un receveur de la même espèce l'hématotoxicité des radiations ionisantes [1]. Les vingt dernières années ont vu progresser considérablement la caractérisation fonctionnelle des cellules souches sanguines, qui a permis en retour leur identification directe sur des critères physiques et, surtout, moléculaires. Progressivement a aussi été reconnue l'existence de cellules souches spécialisées dans de nombreux autres tissus, y compris dans le système nerveux central, même si les cellules souches de l'hématopoïèse demeurent encore, et de loin, les mieux caractérisées. Au moins les différents lignages tissulaires, tôt ségrégués au cours du développement, demeureraient-ils clairement distincts en termes de filiations cellulaires. Pourtant on a récemment, et à plusieurs reprises, observé dans l'organisme développé des relations ontogénétiques inattendues entre le système sanguin et des tissus aussi distincts que le foie, le cerveau et le muscle.

Nous nous proposons de rappeler ici ces données mais nous évoquerons tout d'abord le compartiment cellulaire dont la parenté avec la lignée hématopoïétique est la mieux reconnue, celui des cellules endothéliales vasculaires.

1. Cellules souches angio-hématogènes

En 1932, Paul Murray [2] désigne sous le terme d'*hémangioblastes* les amas de cellules mésodermiques qui, dans l'aire extraembryonnaire, donnent naissance aux premiers vaisseaux contenant les premières cellules hématopoïétiques, adhérant en foyers à l'endothélium. On appellerait plutôt aujourd'hui ces amas *îlots sanguins* mais le terme d'hémangioblaste a demeuré - et a même connu récemment un regain de popularité - pour désigner une cellule unique à l'origine des cellules hématopoïétiques et endothéliales. L'existence de telles cellules souches angio-hématopoïétiques au cours du développement embryonnaire précoce est donc une notion ancienne [3]. Cellules endothéliales et cellules hématopoïétiques expriment effectivement, depuis les stades très précoces du développement, des marqueurs communs tels que MB1/QH1 chez l'oiseau [4, 5], CD31 chez l'homme [6] ou CD34 chez la souris [7] et chez l'homme [8]. Les deux lignages sont absents chez les embryons dans lesquels le gène codant Flk-1, le récepteur 2 du VEGF, a été inactivé [9], et fortement réduits dans le sac vitellin après recombinaison homologue du gène du TGFβ1 [10]. On sait par ailleurs que la surexpression de *scl/tal1* chez l'embryon de poisson mène à une production accrue de cellules hématopoïétiques *et* vasculaires [11]. Toutes ces observations suggèrent, mais ne prouvent pas, l'origine embryonnaire commune des compartiments hématopoïétique et endothélial. Une démonstration plus directe de l'existence de cellules souches angio-hématogènes a été faite dans le modèle des cellules souches embryonnaires de souris (cellules ES), qui sont des cellules multipotentiellles du blastocyste immortalisées en culture. Ainsi les corps embryonnaires, qui représentent la descendance immédiate des cellules ES, incluent-ils des cellules donnant naissance à la fois, à l'échelon unicellulaire, aux cellules de l'hématopoïèse primitive et définitive [12] et à des cellules de type endothélial [13]. De tels *hémangioblastes* produits à partir de cellules ES répondent au VEGF et expriment son récepteur Flk-1 [14]. Eichman et al. [15] ont effectivement trié au moment de la gastrulation de l'embryon d'oiseau une population de cellules mésodermiques Flk-1⁺ donnant naissance à une descendance de cellules hématopoïétiques *ou* endothéliales selon les conditions de culture utilisées.

Les souches communes des lignées vasculaire et sanguine seraient donc, comme attendu, des cellules mésodermiques très primitives. Pour certains auteurs cependant ces hémangioblastes embryonnaires seraient, au moins pour certains d'entre eux, déjà engagés dans le lignage endothélial dont ils exprimeraient le marqueur VE-cadherine [16]. Hamaguchi et ses collaborateurs [17] ont eux montré que les cellules exprimant le récepteur Tie-2 triées de la région de l'aorte embryonnaire peuvent se différencier, en culture clonale, en cellules endothéliales *et* hématopoïétiques. On est ainsi revenu à la notion d'*endothélium hématogène*, énoncée dès le début du 20^{ème} siècle [3] (Sabin, en 1920, désignait d'ailleurs par le terme d'*angioblastes*, et non d'hémangioblastes, ces cellules souches angio-hématopoïétiques), selon laquelle certaines cellules endothéliales embryonnaires peuvent se diviser et redonner naissance à des cellules hématopoïétiques. Dans un modèle de différenciation endothéliale des cellules ES de souris, l'expression de l'intégrine α4 marquerait la transition d'une population de cellules endothéliales Flk-1⁺ vers une descendance de cellules sanguines [18]. Lorsque l'on injecte la molécule AcLDL (acetylated low-density lipoprotein) dans la circulation de l'embryon d'oiseau afin d'en marquer toute la surface interne des vaisseaux sanguins on voit ensuite se développer une population de cellules hématopoïétiques AcLDL⁺, ce qui suggère le pouvoir hématogène de l'endothélium vasculaire embryonnaire [19]. Des conclusions en partie distinctes ont été tirées de l'étude récente de la région AGM (Aorte-Gonades-Mesonephros) humaine [8] dans laquelle les cellules souches de l'hématopoïèse définitive émergeraient d'abord à partir d'une population de cellules CD34⁺ Flk-1⁺ distincte du compartiment endothélial [20 et résultats non publiés]. L'existence d'un progéniteur endothélial intermédiaire demeure néanmoins, dans ce cas également, possible.

Alors que la recherche d'hémangioblastes a été jusqu'à présent restreinte aux stades les plus précoces de l'ontogenèse on doit relever la description récente d'une sous-population de cellules hématopoïétiques humaines CD34⁺ exprimant également le récepteur Flk-1. Ces cellules Flk-1⁺, qui représentent moins de 0,5 % des cellules CD34⁺, sont rencontrées dans le sang de cordon ombilical mais aussi dans la moelle osseuse et le sang de l'adulte [21]. Considérablement enrichies en cellules hématopoïétiques très primitives (LTC-IC, SRC), ces cellules pourraient représenter une population d'hémangioblastes persistant chez l'adulte.

Il a donc fallu attendre plus de 70 ans pour que la notion intuitive de cellule souche angio-hématopoïétique déduite des observations des embryologistes du début du 20^{ème} siècle commence à être étayée expérimentalement. Les démonstrations récentes sont néanmoins fondées sur l'utilisation du modèle quelque peu artificiel des cellules ES et il demeure à établir de façon non équivoque que de telles cellules souches émergent au cours du développement normal, et éventuellement persistent jusqu'à la vie adulte.

2. Filiations cellulaires réciproques inédites entre moelle osseuse et autres tissus d'origine mésodermique

Les travaux pionniers de Friedenstein, à partir des années 1970, ont été largement repris et confirmés au cours de la dernière décennie et il est maintenant admis que des cellules indifférenciées appartenant au stroma de la moelle osseuse hématopoïétique sont capables *in vitro* de former différents compartiments cellulaires mésodermiques : ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, y compris ceux que l'on ne rencontre pas normalement dans la moelle tels que myoblastes et myotubes [22]. Ainsi est née la notion de "cellule souche mésenchymateuse" persistant chez l'adulte et greffable par voie intraveineuse dans différents tissus [23]. L'injection dans la circulation de moelle osseuse totale mène même à la régénération des fibres musculaires striées lésées expérimentalement par un traitement chimique [24]. Curieusement, cette régénération est observée aussi bien après injection des cellules médullaires adhérentes que de la fraction non adhérente des cellules hématopoïétiques, dans laquelle la présence de cellules "mésenchymateuses" n'est pas attendue [24]. Effectivement, l'injection intraveineuse de cellules souches hématopoïétiques médullaires Sca-1⁺, c-kit⁺, CD43⁺, CD45⁺, Lin⁻, CD34⁻ chez la souris *mdx* mène à une régénération musculaire partielle, par des myotubes exprimant la dystrophine, même si cet effet n'est observé qu'après au moins 8 semaines et injection d'une quantité élevée de cellules souches [25].

Inversement, des cellules mononucléées totales de muscle strié injectées chez la souris irradiée létalement y reconstituent l'hématopoïèse de 10 à 14 fois plus efficacement que ne le fait la moelle osseuse, en termes de quantité de cellules sanguines produites [26]. Les cellules musculaires responsables de cette reconstitution de l'hématopoïèse ne sont pas connues mais pourraient appartenir à une population de cellules Sca-1⁺, c-kit⁺, affichant une rétention limitée du colorant vital Hoechst 33342 mais n'exprimant pas CD45 [26].

On peut donc interpréter tous ces résultats dans le sens de l'existence et de la persistance chez l'animal adulte d'une population de cellules souches très primitives de différents compartiments d'origine mésodermique, incluant le lignage hématopoïétique. Le rôle physiologique normal qu'auraient de tels progéniteurs par rapport aux cellules souches spécifiques des différents tissus demeure à établir. On peut se rappeler qu'en 1992, Huang et Terstappen [27] avaient décrit le développement simultané, à partir d'un progéniteur isolé de la moelle osseuse fœtale humaine de 15 semaines (stade auquel celle-ci est déjà largement différenciée), de cellules hématopoïétiques et de cellules stromales adhérentes. Ces résultats n'avaient pu alors être reproduits mais en 1995 Ralf Huss et ses collaborateurs [28] ont observé la production de progéniteurs hématopoïétiques *in vitro* par une lignée de cellules stromales médullaires de chien, bien que ces résultats eux-même n'aient pas été confirmés.

La distribution anatomique naturelle dans les tissus du fœtus et de l'adulte de telles cellules souches mésodermiques ancestrales demeure à établir. Des résultats expérimentaux récents suggèrent néanmoins que la paroi de certains vaisseaux pourrait héberger de tels progéniteurs. H. Fleming (Portland, OR) a rapporté au

congrès 1999 de l'ISEH que la transplantation, sous la capsule rénale d'une souris hôte irradiée létalement, de gros vaisseaux cardiaques disséqués d'un animal donneur mène à une reconstitution hématopoïétique [29]. Les vaisseaux greffés avaient été soigneusement débarrassés de toute cellule sanguine circulante ; en revanche l'analyse histologique des greffons développés a suggéré la prolifération de cellules hématopoïétiques à partir de la paroi vasculaire, rappelant les agrégats de cellules souches observés dans l'aorte embryonnaire [8]. Dans l'adventice des sinusoides de la moelle osseuse, les péricytes, qui expriment l'actine du muscle lisse, représentent des progéniteurs des cellules stromales de l'hématopoïèse [30]. Les propriétés ostéochondrogéniques des péricytes des vaisseaux de la rétine de bœuf sont, par ailleurs, connues [31]. Dès 1961, J. Trueta avait émis l'hypothèse d'une filiation, au cours de l'ostéogenèse, entre cellules endothéliales vasculaires et, respectivement, ostéoblastes et ostéoclastes pour le développement et la résorption osseuse [32]. On a aussi récemment suggéré que la paroi de l'aorte dorsale embryonnaire, qui montre *in vitro* un potentiel myogénique [33], pouvait participer à la formation des cellules satellites du muscle. La paroi vasculaire pourrait donc constituer un réservoir de cellules souches mésodermiques multipotentiels qui seraient distribuées dans les tissus au cours de leur développement, de leur renouvellement et de leur réparation [34 et G. Cossu, communication personnelle].

3. De l'épithélium hépatique dérivé du mésoderme, et des cellules hématopoïétiques d'origine ectodermique ?

Les régénérations cellulaires croisées observées entre muscle et moelle, et la présence dans cette dernière de cellules souches osseuses, cartilagineuses ou vasculaires sont certes intrigantes mais demeurent "acceptables" pour l'embryologiste puisqu'elles restent confinées à la descendance du feuillet embryonnaire mésodermique. Plus hérétique peut apparaître la conclusion d'une étude dans laquelle une injection de moelle osseuse a contribué à la régénération des hépatocytes et des canaux biliaires préalablement lésés par le tétrachlorure de carbone [35]. Ces compartiments cellulaires sont en effet purement épithéliaux et leur origine embryonnaire dans un diverticule de l'endoderme duodénal est bien connue ; or l'on ne connaît aucune contribution de l'endoderme à l'histogenèse de la moelle osseuse. Les données les plus récentes suggèrent pourtant que ces observations reflètent effectivement une transition méso-endodermique. E. Lagasse (StemCells Inc.) vient en effet de rapporter au congrès annuel de la Society for Experimental Biology, tenu au mois d'avril à San Diego, la régénération d'hépatocytes fonctionnels à partir non plus de moelle osseuse totale mais de seulement une cinquantaine de *cellules souches hématopoïétiques* très primitives triées à partir de la moelle. Ces cellules souches que l'on croyait vouées de façon irrémédiable à la production de cellules sanguines peuvent-elles donc adopter un programme de différenciation radicalement différent, ou incluent-elles des éléments beaucoup plus primitifs, situés bien en deçà de l'origine de l'hématopoïèse ? Egalement étonnante est la description d'une contribution à l'hématopoïèse de cellules souches neurales injectées dans la circulation de souris irradiées. Ces cellules souches neurales cultivées à partir du cerveau embryonnaire antérieur ou de son dérivé chez l'adulte, et qui donnent naissance *in vitro* à une triple descendance de neurones, d'astrocytes et d'oligodendrocytes auraient produit chez le receveur des progéniteurs clonogéniques macrophagiques et granulo-macrophagiques et des cellules lymphoïdes différenciées [36]. On sait qu'une transition entre ectoderme et tissus "mésodermiques" a lieu aux stades précoces de l'embryogenèse, puisque la crête neurale céphalique donne naissance notamment à l'ossature de la face [37]. La réorientation vers l'hématopoïèse de cellules neurectodermiques chez l'adulte est, en revanche, une observation très troublante.

Pourtant d'autres exemples existent, dans l'autre direction, de relations ontogénétiques entre cellules des systèmes sanguin et nerveux. La moelle osseuse de souris adultes traitées par le 5-FU, injectée dans des souris hôtes conditionnées par irradiation à 4,5 Gy, y a comme attendu donné naissance à une population de cellules microgliales, qui appartiennent à la lignée monocyttaire, mais aussi, de façon surprenante, à une descendance de cellules exprimant le marqueur astroglial GFAP (glial fibrillary acidic protein), représentant de 0,5 à 2 % des cellules dérivées du

donneur [38]. Une génération d'astrocytes GFAP⁺ a aussi été observée après injection intracérébrale stéréotaxique chez la souris de cellules stromales de moelle osseuse sélectionnées par adhérence au plastique [39].

Conclusions

C'est autour du système hématopoïétique, dont la manipulation expérimentale *in vivo* est particulièrement bien maîtrisée, que l'on révèle actuellement des capacités de régénération intertissulaires qui n'avaient pas été suspectées précédemment. Une communauté d'origine comme celle qui rassemble vraisemblablement cellules sanguines et endothéliales en un seul lignage embryonnaire avait été suggérée depuis longtemps et est en passe d'être démontrée expérimentalement. En revanche l'existence de progéniteurs mésodermiques divers au sein du stroma de la moelle osseuse et, même, parmi les cellules souches hématopoïétiques qui y résident demeure une donnée très originale et intéressante, qui peut susciter des espoirs dans le domaine des thérapies génique et cellulaire [40]. Simultanément se déroulent d'actives recherches sur les cellules souches plus "classiquement" spécialisées dans le développement et la réparation des différents tissus de l'organisme, par exemple les épithéliales [41] et le système nerveux [42]. On envisage par ailleurs de contrôler l'émergence de différents lignages cellulaires à partir de cellules ES humaines et d'ouvrir ainsi des perspectives de "clonage thérapeutique" [43]. Nombreux sont donc les scénarios actuellement envisagés de thérapie utilisant des cellules progénitrices. Néanmoins, l'hypothèse de l'existence chez l'adulte de filiations cellulaires entre des tissus d'origines embryonnaires distinctes, ecto-, endo- ou mésodermique, a rencontré un scepticisme attendu, notamment de la part des biologistes du développement. La production de cellules hématopoïétiques à partir de cellules souches neurales n'a pu être encore obtenue par les différents laboratoires qui tentent de reproduire ces expériences. Il n'est pas clairement démontré que les cellules utilisées originellement par Bjornson et al. provenaient d'un progéniteur neural unique, et non de deux cellules distinctes mais physiquement étroitement associées. Pourtant, on vient juste de suggérer un potentiel encore beaucoup plus vaste de cellules souches neurales isolées du cerveau de souris adulte. Injectées dans la cavité amniotique d'embryons de poulet ou agrégées dans des morulas de souris ces cellules ont en effet contribué au développement de multiples tissus d'origine ectodermique mais aussi mésodermique (rein, cœur, muscle) et endodermique (épithélium respiratoire et digestif, foie) [44].

La plupart des auteurs qui défendent l'existence, même chez l'adulte, de cellules souches à très vaste potentiel de différenciation au sein du compartiment mésodermique, ou même hors de ses limites, évoquent généralement une grande *plasticité* de certaines cellules matures et de leurs progéniteurs immédiats, qui pourraient dans certaines conditions *se dédifférencier* et *se transdifférencier*. Une autre possibilité est que de rares cellules souches embryonnaires totipotentiellles persistent dans les tissus jusqu'aux stades adultes. L'existence de tels éléments, vierges de tout engagement dans l'un ou dans l'autre lignage cellulaire, pourrait expliquer l'ensemble des observations que nous venons de résumer. On peut néanmoins s'étonner qu'un tel potentiel n'ait pas été perçu précédemment. Il est en effet important de rappeler ici que, pour spectaculaires et passionnantes que soient ces observations récentes, le rôle que pourraient avoir de telles cellules souches originelles dans la maintenance de l'organisme développé normal demeure totalement obscur. En effet, ces potentialités précédemment inimaginables ont été révélées dans des conditions expérimentales extrêmes où l'organisme était soumis à des conditionnements particulièrement draconiens, ou encore dans des montages expérimentaux entièrement artificiels (chimères d'agrégation).

Les cellules à l'origine de ces restaurations tissulaires insoupçonnées ne devraient pas résister longtemps aux techniques d'analyse et de tri mises actuellement en jeu pour les identifier. On devrait alors déterminer si de telles capacités de régénération ont pour origine le maintien chez l'adulte de cellules souches ancestrales, ou la surprenante plasticité de cellules plus différenciées.

Bibliographie

1. Lorenz E and Congdon CC. Modification of lethal irradiation injury in mice by injection of homologous or heterologous bone. *J Nat Cancer Instit* 1954 ; 14 : 955-961.
2. Murray PDF. The development in vitro of blood of the early chick embryo. *Proc R Soc London [B]* 1932 ; 111 : 497-521.
3. Sabin FR. Studies on the origin of blood vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Carnegie Inst Wash Pub n°272. Contrib Embryol* 1920 ; 9 : 214-262.
4. Péault B, Thiery JP, Le Douarin NM. Surface marker for hemopoietic and endothelial cell lineages in quail that is defined by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983 ; 80 : 2976-2980.
5. Pardanaud L, Altmann C, Kitos P, Dieterlen-Lièvre F, and Buck CA. Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 1987 ; 100 : 339-349.
6. Watt SM, Williamson J, Geneviev H, Fawcett J, Simmons DL, Hatzfeld A, Nesbitt SA, Coombe DR. The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34⁺ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. *Blood* 1993 ; 82 : 2649.
7. Young PE, Baumhueter S, and Lasky LA. The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood* 1995 ; 85 : 96-105.
8. Tavian M, Hallais MF and Péault B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development* 1999 ; 126 : 793-803.
9. Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fisher KD, Schuch AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J. A requirement for Flk-1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997 ; 89 : 981-990.
10. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 1995 ; 121 : 1845-1854.
11. Gering M, Rodaway ARF, Göttgens B, Patient RK, and Green AR. The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J* 1998 ; 17 : 4029-4045.
12. Kennedy M, Firpo M, Choi K, Wall C, Robertson S, Kabrun N, Keller G. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 1997 ; 386 : 488-493.
13. Choi K, Kennedy M, Kasarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998 ; 125 : 725-732.
14. Nishikawa SI, Nishikawa S, Kawamoto H, Yoshida H, Kizumoto M, Kataoka H, and Katsura Y. In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity* 1998 ; 8 : 761-769.
15. Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Bréant C, Le Douarin NM. Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 5141-5146.
16. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, and Kodama H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherine+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 1998 ; 125 : 1747-1757.
17. Hamaguchi I, Huang XL, Takakura N, Tada JI, Yamaguchi Y, Kodama H, and Suda T. In vitro hematopoietic and endothelial cell development from cells expressing TEK receptor in murine Aorta-Gonad-Mesonephros region. *Blood* 1999 ; 93 : 1549-1556.
18. Ogawa M, Kizumoto M, Nishikawa S, Fujimoto T, Kodama H, and Nishikawa SI. Expression of $\alpha 4$ -integrin defines the earliest precursor of hematopoietic cell lineage diverged from endothelial cells. *Blood* 1998 ; 93 : 1168-1177.

19. Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, and Dieterlen-Lièvre F. Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* 1998 ; 125 : 4575-4583.
20. Cortés F, Debacker C, Péault B and Labastie MC. Differential expression of KDR/Flk-1 and CD34 defines distinct stages of endothelial and hematopoietic development in early human embryos. *Mech Dev* 1999 ; 83 : 161-164.
21. Ziegler BL, Valtieri M, Almeida Porada G, De Maria R, Müller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C. KRD receptor : a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 1999 ; 285 : 1553-1558.
22. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* 1997 ; 276 : 71-74.
23. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, and Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 4857-4861.
24. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998 ; 279 : 1528-1530.
25. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999 ; 401 : 390-394.
26. Jackson KA, Mi T, and Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *PNAS* 1999 ; 96 : 14482-14486.
27. Huang S, Terstappen LWMM. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 1992 ; 360 : 745-749.
28. Huss R, Hong DS, McSweeney PA, Hoy CA, Deeg HJ. Differentiation of canine marrow cells with hematopoietic characteristics from an adherent stromal cell precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92:748-752.

29. Fleming WH, Mulcahy JM, Montfort MJ. Transplantation of adult vascular tissue protects mice from lethal irradiation. ISEH '99, 28th annual scientific meeting, July 10-14, 1999, Monte Carlo, Monaco (abstract).
30. Rémy-Martin JP, Marandin A, Challier B, Bernard G, Deschaseaux M, Hervé P, Wei Y, Tsuji T, Auerbach R, Dennis JE, Moore KA, Greenberger JS, Charbord P. Vascular smooth muscle differentiation of murine stroma. A sequential model. *Exp Hematol* 1999 ; 27 : 1782-1795.
31. Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME and Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1998 ; 13 : 828-838.
32. Trueta J. The role of the vessels in osteogenesis. *J Bone and Joint Surgery* 1963 ; 45 B : 402-418.
33. De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, Cossu G. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 1999 ; 147 : 869-878.
34. Bianco P and Cossu G. *Uno, nessuno e centomila* : Searching for the identity of mesodermal progenitors. *Exp Cell Res* 1999 ; 251 : 257-263.
35. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999 ; 284 : 1168-1170.
36. Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999 ; 283 : 534-537.
37. Le Douarin N and Kalcheim C. The neural crest. In : *Developmental and cell biology series*. Cambridge University Press, 1999, 2nd édition : 60-152.

38. Eglitis MA and Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 4080-4085.
39. Koppen GC, Prockop DJ, and Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 10711-10716.
40. Gerson SL. Mesenchymal stem cells: No longer second class marrow citizens. *Nature Med* 1999 ; 5 : 262-264.
41. Slack JMW. Stem cells in epithelial tissues. *Science* 2000 ; 287 : 1431-1433.
42. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000 ; 287 : 1433-1438.
43. Watt FM and Hogan BLM. Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science* 2000 ; 287 : 1427-1430.
44. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlström H, Lendahl U, Frisén J. *Science* 2000 ; 288 : 1660-1663.

II

CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏTIQUES

ET

CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES

Laure Coulombel

Directeur de Recherche

INSERM U.474

Hôpital Port Royal

QS 1 : modèle cellulaire :

Modèle utilisé dans l'équipe : le tissu hématopoïétique humain essentiellement, moelle osseuse, sang de cordon, sang périphérique.

Questions posées : Peut-on identifier des cellules souches multipotentes humaines et analyser le contrôle de leurs propriétés par des signaux externes provenant de l'environnement médullaire ? Nous avons notamment démontré (1) qu'il existe dans le sang de cordon humain des cellules qui, à l'échelon unicellulaire *in vitro*, produisent toutes les cellules sanguines, et sont capables d'établir une hématopoïèse active chez la souris immunodéficiente ; (2) que le contact avec les cellules stromales retarde la différenciation de cellules souches humaines de la moelle osseuse, et stimule transitoirement leur " autorenouveaulement ".

Trois sources de cellules souches hématopoïétiques (CSH) existent chez l'homme : la moelle osseuse, le sang de cordon ombilical (physiologique) et le sang périphérique des patients adultes traités par chimiothérapie et/ou par des cytokines (celles-ci entraînant le passage des CSH dans la circulation). Toutes trois sont utilisées couramment en transplantation pour : (1) remplacer toute ou partie des lignées du système hématopoïétique dans des pathologies où il y a un dysfonctionnement d'une ou plusieurs lignées ; (2) pour pallier transitoirement le déficit en cellules matures qu'entraînent les traitements anticancéreux ; (3) plus rarement, comme cibles de stratégies de thérapie génique lorsqu'une allo- (auto)-greffe curative n'est pas possible.

Il faut savoir que la moelle osseuse contient d'autres cellules souches que les CSH : des cellules souches mésenchymateuses, des précurseurs endothéliaux capables de contribuer à une angiogenèse adulte, et d'autres cellules contribuant à la régénération d'autres tissus (muscle, foie). Les cellules souches mésenchymateuses, contribuent, elles, à la reconstruction osseuse ou cartilagineuse, peuvent être amplifiées *in vitro*, et sont, à ce titre, utilisées dans des essais thérapeutiques dans des pathologies ostéoarticulaires, ostéogenèse imparfaite, ou en chirurgie orthopédique.

QS 2 à 5 : Potentiel de différenciation, mise en culture et propriétés des cellules souches hématopoïétiques.

Si on adopte une définition stricte (la terminologie est très “laxiste”), qualifier une cellule de “souche hématopoïétique” revient à démontrer sa capacité de produire, après implantation *in vivo*, toutes les cellules matures du sang, et ce pendant la durée de vie de l’individu. L’existence de telles cellules a été démontrée *in vitro et in vivo* chez la souris, et aussi *in vitro* chez l’homme, du moins dans le sang de cordon.

Or, chez l’homme, le paradoxe est que ces propriétés ont été définies *a posteriori* sur l’observation du succès des transplantations de moelle, soit dans un modèle murin syngénique (1960) soit chez l’homme à partir de 1970.

Si le succès de l’utilisation des CSH en thérapeutique humaine est indiscutable, rares sont les patients qui peuvent en bénéficier. Les principales restrictions sont liées (1) à la barrière immunologique dans le cas de greffes allogéniques, (2) à la pathologie elle-même, (3) surtout à la difficulté d’accroître le nombre des CSH sans qu’elles perdent leur potentiel, ce qui freine leur utilisation dans des situations de greffes autologues, compromet le transfert de gènes thérapeutiques et s’oppose à la création de “banques” de cellules souches primaires purifiées, disponibles à la demande, telles qu’elles peuvent être envisagées pour d’autres catégories de cellules souches. Ce problème de l’incompatibilité de divisions cellulaires avec le maintien d’un potentiel est très spécifique des cellules souches hématopoïétiques, et les distingue donc radicalement des cellules souches nerveuses, ou mésenchymateuses.

C’est essentiellement l’exploration du fonctionnement de ces CSH et la connaissance des signaux contrôlant leurs propriétés d’un point de vue fondamental qui permettra de répondre à ces limitations, qui freinent le développement de l’utilisation thérapeutique des CSH. Or, les caractéristiques des CSH compliquent leur étude expérimentale : leur rareté ($< 1/10^5$ cellules mononucléées), l’impossibilité de les purifier à homogénéité (absence de critères phénotypiques), et l’impossibilité actuelle de les amplifier sans entraîner simultanément leur différenciation, c’est-à-dire la perte de leurs caractères “cellules souches”, rend extrêmement difficile le travail à partir de cellules primaires de tissus adultes vivants. *In vitro*, il n’est guère possible de maintenir une hématopoïèse active (c’est-à-dire la production de cellules différenciées) au-delà de quelques semaines, et *in vivo*, au-delà de 4-7 mois dans le modèle xénogénique des souris immunodéficientes, et ceci par épuisement des cellules souches initiales. Un des moyens de dépasser ces difficultés serait l’utilisation de cellules embryonnaires humaines (*voir ci-dessous*).

L’autre obstacle majeur est l’évaluation des conséquences de la manipulation des CSH chez l’homme en l’absence de modèle expérimental totalement satisfaisant, *in vitro ou in vivo*, permettant de reproduire les propriétés des CSH humaines.

On peut arguer que de telles études fondamentales sont possibles dans le système murin où existe un système de transplantation syngénique *in vivo* très performant, et où les cellules ES (*embryonic stem cells*) ont été largement utilisées, notamment pour étudier les effets de la surexpression inappropriée (transgéniques), de l’inactivation (knock-out) de gènes, ou de leur expression physiologique dans le temps et l’espace (knock-in). Le fait est que beaucoup de nos connaissances sur le contrôle de l’hématopoïèse proviennent de l’analyse de ces

mutants. Cependant, même si les étapes clés de la prolifération et de la différenciation des CSH murines et humaines sont probablement identiques, les acteurs de la régulation fine des CSH diffèrent suffisamment dans ces deux espèces en ce qui concerne la réponse aux molécules régulatrices (cytokines) pour que les résultats obtenus chez la souris ne soient pas directement extrapolables à la manipulation des cellules humaines. Signalons aussi que d'autres facteurs entrent en jeu, comme la taille, la durée de vie qui sont très éloignés chez l'homme et la souris. Dernier argument, les conditions de développement *in vitro* des cellules ES murines et humaines sont totalement différentes, rendant toute extrapolation risquée.

Pour essayer de pallier l'absence de modèle expérimental mimant une transplantation *in vivo* à long-terme chez l'homme, des modèles de transplantation de cellules humaines à l'animal ont été proposés. Cette situation forcément xénogénique est donc entachée d'artéfacts. Les cellules humaines sont injectées soit à des souris immunodéficientes, soit *in utero* à des foetus de gros animaux (mouton). Certes, on obtient un certain degré de chimérisme dans les deux cas, et ce à long-terme, mais aucun de ces modèles ne permet d'évaluer l'ensemble des propriétés des cellules hématopoïétiques de façon satisfaisante, et en particulier la différenciation terminale des cellules y est très incomplète, et la fonction des cellules, critère essentiel dans une optique thérapeutique, ininterprétable.

Contribution potentielle de l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines à la compréhension de l'hématopoïèse fondamentale:

Par analogie à ce qu'a apporté à la compréhension de l'hématopoïèse murine l'utilisation de cellules souches embryonnaires, celle de cellules embryonnaires humaines serait certainement d'un grand intérêt : un premier avantage de ces cellules ES indifférenciées est leur obtention en grand nombre, puisqu'elles se multiplient *in vitro* sans perdre leur propriété de totipotence, et que l'induction de leur différenciation est contrôlable à tout moment par l'expérimentateur. Un second avantage est la facilité avec laquelle on peut modifier le génome de ces cellules, en surexprimant, délétant, ou remplaçant un gène d'intérêt, permettant d'en analyser les conséquences sur la différenciation hématopoïétique. Il n'est pas exclu non plus d'immortaliser certaines de ces cellules, soit à un stade indifférencié, soit à une étape de différenciation qui aura été choisie. C'est cette disponibilité de cellules homogènes et de potentiel identique qui fait la valeur de ce matériel.

A condition que l'on soit capable d'amplifier les cellules ES humaines comme l'ont été les cellules ES murines, et de mettre au point les conditions de leur différenciation en cellules souches hématopoïétiques puis en précurseurs matures des différentes lignées, ce qui demande un travail d'adaptation technique, et n'est pas à l'heure actuelle publié, leur utilisation permettrait d'avancer dans plusieurs directions :

Sur le plan fondamental :

- Les cellules ES sont les seules cellules dans lesquelles on peut, à l'heure actuelle, remplacer un gène par un autre à la même place (technique de recombinaison homologue, théoriquement idéale pour une thérapie génique). Cette approche n'est pas faisable dans les cellules primaires hématopoïétiques ;
- Le caractère embryonnaire des cellules ES permettrait d'analyser les événements moléculaires contrôlant la transition entre une cellule mésodermique totipotente et une cellule souche hématopoïétique. Ces étapes ne

sont pas abordables chez l'adulte, mais leur connaissance est fondamentale pour l'avenir si l'hypothèse se confirmait qu'existent, chez l'adulte, des cellules ayant conservé un potentiel proche du potentiel totipotent des cellules embryonnaires ;

- La possibilité d'analyser les gènes responsables du couplage entre prolifération et différenciation qui caractérise très spécifiquement les CSH. Leur identification ouvrirait peut-être la voie à des stratégies dissociant ces deux propriétés ;
- Les cellules ES peuvent établir *in vitro* un environnement embryonnaire très permissif puisqu'à ce stade existe une amplification cellulaire maximale. Cet environnement est donc probablement la source (1) de molécules régulatrices (cytokines), qui ne seraient présentes qu'à l'état embryonnaire et seraient, à ce stade seulement, responsables de l'amplification des CSH ; (2) de signaux environnementaux contribuant à l'acquisition ou l'expression, par une cellule souche adulte, par exemple hématopoïétique, d'un potentiel autre que celui du tissu où elle réside, par exemple musculaire, ou hépatique. Il apparaît donc essentiel d'identifier ces molécules.

Sur le plan thérapeutique :

Les 4 points fondamentaux abordés ci-dessus pourraient avoir un intérêt thérapeutique certain : non seulement dans l'hypothèse futur(iste) de l'utilisation des cellules ES elles-mêmes, mais également parce que les mécanismes décryptés à partir de l'étude des cellules ES pourraient s'appliquer à des cellules primaires adultes, être vérifiés et offrir ainsi une base pour de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à moduler le potentiel des CSH.

Parmi celles-ci,

- S'il s'avérait possible de découpler prolifération et différenciation dans le compartiment des cellules souches, du moins transitoirement, cela pourrait être exploité pour amplifier des cellules souches hématopoïétiques (*cf ci dessus*) ;
- Si des molécules d'origine embryonnaire essentielles à l'amplification de cellules souches ou à l'induction de leur différenciation sont identifiées, elles pourraient être testées sur des cellules souches adultes et à terme contribuer à définir des conditions spécifiques pour reconstituer tel ou tel tissu et à partir d'une seule population de cellules souches de moelle osseuse par exemple.

Dans une perspective à plus long terme utilisant les cellules ES elles-mêmes,

- La recombinaison homologe évoquée ci-dessus, suivie d'une amplification sélective des cellules dans une voie tissulaire donnée, aurait un intérêt pour corriger un tissu malade ;
- Le caractère embryonnaire des cellules peut aider à minimiser une réaction immunologique dans une situation de greffe.

Il ne faut pas nier les difficultés inhérentes à la manipulation des cellules ES en général : certaines sont inhérentes à ce matériel (différenciation *in vitro* incomplète, difficultés de culture, rapidité d'évolution, cycle cellulaire très particulier, impossibilité de reconstituer le système hématopoïétique d'une souris irradiée après injection de cellules ES), d'autres, plus inattendues et récemment révélées, semblent spécifiques des cellules ES humaines, dont la culture *in vitro* apparaît beaucoup plus délicate que celle des cellules ES murines. Ceci pourrait indiquer que la régulation de ces cellules dans les deux espèces diffèrent profondément, et inciter à analyser ces différences. Il est donc essentiel compte tenu de la limitation des approches expérimentales sur les

cellules primaires adultes chez l'homme, et de la divergence évoquée avec les cellules ES murines, de pouvoir étudier, si cela s'avère techniquement possible, le potentiel hématopoïétique cellules ES humaines .

QS 8- Voie d'accès au tissu cible :

D'un point de vue pratique, la greffe de CSH ne pose aucun problème : les cellules " donneur " sont très facilement collectées, et la greffe se fait par voie intraveineuse. En effet, les CSH retournent d'elles-mêmes dans le tissu médullaire, le colonisent et y prolifèrent. Si ceci est vrai des CSH obtenues à partir de donneurs adultes, il n'en est probablement pas de même des cellules souches embryonnaires, d'après les données obtenues chez la souris. Soulignons à ce propos que l'étude des mécanismes de migration cellulaire qui contrôlent ce " *homing* " spécifique des cellules CSH vers le tissu médullaire est aussi essentiel dans l'avenir à l'amélioration des techniques de greffe de CSH.

QS 9 : Utilité thérapeutique des cellules souches présentes dans la moelle osseuse :

Il est préférable dans ce paragraphe de considérer non pas les cellules souches hématopoïétiques, mais la moelle osseuse en tant que tissu utilisable.

Cellules souches hématopoïétiques : Il existe trois situations pathologiques où les CSH sont utilisées dans un but thérapeutique :

- Greffes allogéniques à partir des cellules d'un donneur apparenté sain : remplacement des CSH déficientes ou trop peu nombreuses,
- Greffe autologue de cellules hématopoïétiques, pas nécessairement " souches ", pour pallier les conséquences néfastes de la chimiothérapie + radiothérapie. Dans ce cas, il s'agit d'une démarche " transfusionnelle " surtout utilisée dans le traitement des tumeurs solides,
- Remplacement d'un gène déficient ou manquant par transfert de gènes dans des cellules souches hématopoïétiques autologues. Cette approche ne s'applique pour l'instant qu'à des pathologies très sélectionnées où existe un avantage prolifératif des cellules transduites.

Autres cellules souches : La moelle osseuse contient au moins trois autres populations intéressantes en thérapeutique :

- Les cellules souches mésenchymateuses qui, après leur amplification, peuvent être utilisées pour des reconstructions ostéoarticulaires,
- Des cellules participant à la régénération des cellules hépatiques, et du muscle.

III

CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES

ET DEFICITS IMMUNITAIRES

Marina Cavazzana-Calvo

Praticien hospitalier

Directeur du laboratoire de thérapeutique cellulaire et génique

INSERM U. 429

Hôpital Necker - Enfants malades

1 – Type de modèle cellulaire utilisé et espèce.

Depuis de nombreuses années au sein de l'unité INSERM 429, notre équipe centre son travail de recherche sur le tissu hématopoïétique d'origine humaine et murine. Le but est d'essayer de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les patients atteints d'une pathologie acquise ou héréditaire du système lymphohématopoïétique. Deux grands types d'approche thérapeutique sont ciblés : la greffe de moelle osseuse partiellement compatible d'un côté et la thérapie génique de l'autre. Les sources des cellules souches hématopoïétiques utilisées sont la moelle osseuse et le sang de cordon ombilical pour l'homme, la moelle osseuse et la cellule ES pour la souris.

Plus récemment, l'isolement d'une cellule souche médullaire chez l'homme et chez la souris, capable de participer à la régénération des tissus et d'organes autres que les cellules sanguines nous pousse à étendre nos investigations aux possibilités thérapeutiques de cette cellule et à la possibilité de l'immortaliser pour en augmenter les capacités prolifératives.

2 – Compte tenu de la thématique de recherche de cette équipe, nos efforts visent à caractériser les étapes du développement lymphoïde et à préciser les cytokines nécessaires à ce développement pour améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteints de déficits immunitaires. Dans les étapes pré-cliniques de mise au point du protocole de transfert génique dans les CSH, une hiérarchie du potentiel de prolifération et de différenciation entre la cellule souche hématopoïétique provenant d'un sujet adulte et celle isolée du sang de cordon ombilical a pu être décrite d'une façon analogue aux résultats rapportés par d'autres groupes. Par ailleurs, nous avons transitoirement essayé d'obtenir des cellules lymphocytaires à partir des cellules ES de souris sans succès. Des cellules de la lignée érythrocytaire et myéloïde ont été facilement obtenues, l'obtention des cellules lymphoïdes a été empêchée par des problèmes techniques encore sans réponse.

3 – 4 Les CSH peuvent être cultivées et proliférer *in vitro*, malheureusement, malgré une grande amplification des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes, les cellules souches ne sont amplifiées que dans une moindre mesure. Nous ne connaissons pas le milieu ni les facteurs de croissance qui nous permettent de dissocier *in vitro* l'expansion de la différenciation et nous ne savons pas non plus comment nous pouvons remettre " au repos " une cellule qu'on fait proliférer. En effet, les cellules souches responsables de la prise hématologique sont des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire. La maîtrise de ces problèmes nous permettrait d'aborder le transfert de gènes thérapeutiques dans ces cellules d'une façon plus rationnelle.

5 – Les cellules souches de la moelle osseuse injectées par voie intraveineuse repeuplent en grande mesure le tissu hématopoïétique. On dispose aujourd'hui d'informations qui prouvent la capacité de cette cellule à migrer et à se différencier dans d'autres tissus cellulaires tels que le muscle et le foie. La valeur thérapeutique de ces observations potentiellement innovantes reste mal précisée et doit faire l'objet d'études plus approfondies. Pour l'instant chez les petits rongeurs, l'effet thérapeutique de la différenciation musculaire de la cellule souche injectée est loin d'être prouvé. On peut s'interroger sur les faibles capacités de prolifération de cette cellule et sur le besoin d'élargir aux cellules embryonnaires ce type d'étude, en vue de leur plus importante capacité de prolifération.

6 – Les voies d'accès au tissu – cible ne représentent pas aujourd'hui d'obstacle compte tenu des progrès de la chirurgie vasculaire et viscérale.

7 – Nous souhaitons développer une étude systématique de la cellule souche de moelle osseuse et de la possibilité de la faire proliférer davantage en utilisant des outils d'oncorétrovirologie. Ces outils permettent d'introduire des gènes responsables de la prolifération d'une manière réversible. On espère ainsi obtenir un nombre suffisant de cellules souches capables de se différencier vers une cellule somatique bien précise obtenant ainsi la régénération d'un tissu endommagé.

8 – Le clonage thérapeutique représente une voie de recherche intéressante qui peut révolutionner l’approche thérapeutique à bon nombre de pathologies humaines. Un nombre de questions reste à résoudre tant sur le plan scientifique que biologique.

9 – La révision de la loi de bioéthique de 1994 reste un point clé de cette réflexion qui est attendue avec impatience dans le monde de la recherche française.

IV

CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES

Pierre Charbord

Directeur de Recherche INSERM

Unité U506

Hôpital Paul Brousse

Villejuif

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules médullaires multipotentes puisqu'elles donnent naissance aux lignages stromal, adipocytaire, chondrogénique et ostéoblastique, (Caplan, 1991 ; Prockop, 1997). Le lignage stromal assure le maintien de l'hématopoïèse (Dexter et coll., 1976 ; Gartner et Kaplan, 1980) ; le phénotype des cellules de ce lignage est apparenté aux cellules vasculaires musculaires lisses (Galmiche et coll., 1993 ; Rémy-Martin et coll., 1999).

Le caractère souche des CSM s'exprime dans la multipotentialité de ces cellules et dans leur pouvoir de prolifération élevé (Pittenger et coll., 1999 ; Dennis et coll., 1999). L'auto-renouvellement de ces cellules n'a pas été formellement prouvé. Leur capacité de reconstitution a été montrée pour le soutien de l'hématopoïèse (Anklesaria et coll., 1987 ; Nolte et coll., 1994 ; Almeida-Porada et coll., 2000) et la reconstitution de l'ostéogénèse, notamment dans un modèle murin de maladie des "os de verre" (Pereira et coll., 1995 ; 1998 ; Hou et coll., 1999 ; Oyama et coll., 1999).

Plusieurs investigateurs ont décrit, dans la moelle, des cellules à la multipotentialité encore plus large puisqu'elles donnent naissance aux lignages musculaires sarcomériques et à des cellules susceptibles de se différencier en cellules endothéliales, hépatocytaires, astrocytaires et neuronales (Wakitani et coll., 1995 ; Saito et coll., 1995 ; Azizi et coll., 1998 ; Kopen et coll., 1999 ; Makino et coll., 1999 ; Verfaillie, communication personnelle, Août 2000). Ces différenciations n'ont toutefois pas été prouvées au niveau clonal. Il est possible qu'elles témoignent d'une reprogrammation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou de la persistance de cellules souches embryonnaires dans la moelle. Il est également concevable que ces différenciations soient le résultat de la plasticité des CSM, plasticité évidente au niveau de la descendance puisque des adipocytes et des chondrocytes peuvent donner naissance à des ostéoblastes et que les cellules stromales présentent certains caractères propres aux adipocytes (Bianco et Robey, 2000). En toute rigueur nous ne considérons comme CSM que les cellules dont la différenciation a été définie au premier paragraphe.

Les CSM parce qu'elles expriment des antigènes membranaires spécifiques (antigène reconnue par l'anticorps Stro-1 et sous-unité alpha-1 des intégrines) sont aisément isolées à partir de moelle osseuse humaine récoltée par aspiration (Simmons et Torok-Storb, 1991 ; Deschaseaux et Charbord, 2000). L'expression de molécules reconnues par l'anticorps Stro-1 peut également être utilisée pour la séparation des CSM de moelle de souris. La purification des CSM à partir des autres sites de l'hématopoïèse fœtale (le foie fœtal) ou embryonnaire (la région aorte-gonade-mésonephros) n'a pas été décrite ; cependant, il existe des lignées continues du foie fœtal ou de la région aorte-gonade-mésonephros de la souris qui paraissent présenter des caractères de CSM.

La culture de ces cellules nécessite un milieu complexe comportant du sérum de veau fœtal et du sérum de cheval et de l'hydrocortisone (Dexter et coll., 1976 ; Gartner et Kaplan, 1980). Plusieurs investigateurs ont essayé de ne plus utiliser de sérums ou de susciter une prolifération plus importante en présence de sérums, ce qui a permis de mettre en évidence le rôle de plusieurs facteurs de croissance (facteur de croissance fibroblastique, facteur de croissance dérivé des plaquettes, facteur de croissance épidermique, interleukine 1, facteur nécrotique tumoral, facteur transformant de type β) (Oliver et coll., 1990 ; Gronthos et Simmons, 1995 ; Sensebé et coll., 1995).

L'administration systémique de CSM a montré leur migration pulmonaire suivie d'ensemencement au niveau de la moelle, du cartilage et des os (Anklesaria et coll., 1987 ; Nolte et coll., 1994 ; Almeida-Porada et coll., 2000 ; Pereira et coll., 1995 ; 1998 ; Hou et coll., 1999 ; Oyama et coll., 1999). Ces localisations sont plus évidentes après lésions des tissus cibles (secondaires à un déficit congénital en collagène, à une irradiation de la moelle...), ce qui est compatible avec l'augmentation du renouvellement cellulaire entraînée par les lésions. Certains auteurs ont également décrit une réparation osseuse après implantation cellulaire dans une zone de fracture ; cette voie d'accès local aurait l'avantage d'une réparation plus rapide, mais l'inconvénient d'une régénération limitée au point d'implantation.

Ces données soulignent l'intérêt des CSM pour la thérapie cellulaire. La facilité de transfert gènes dans ces cellules en fait également de bons candidats pour la thérapie génique (Bulabois et coll., 1998 ; Brouard et coll., 1998 ; 2000). Thérapies cellulaire et génique peuvent s'appliquer à des maladies aussi différentes que les insuffisances médullaires, les maladies ostéo-articulaires voire les myopathies (en considérant des capacités de différenciation large, ce qui demande à être confirmé ainsi que discuté plus haut).

En conclusion il nous paraît important d'insister sur la propriété de plasticité des CSM qui en font un modèle attractif pour les thérapies cellulaire et génique de nombreuses affections impliquant différentes disciplines médicales.

Bibliographie :

Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED: Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood*, 2000, 95, 3620-3627.

Anklesaria P, Kase K, Glowacki J, Holland CA, Sakakeeny MA, Wright JA, Fitzgerald TJ, Lee CY, Greenberger JS : Engraftment of a clonal bone marrow stromal cell line in vivo stimulates hematopoietic recovery from total body irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84, 7681-7685.

Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ : Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats - similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95, 3908-3913.

Brouard N, Chapel A, Neidez-Nguyen TMA, Granotier C, Khazaal I, Péault B, Thierry D : Transplantation of stromal cell transduced with the human IL3 gene to stimulate hematopoiesis in human fetal bone grafts in non-obese, diabetic-severe combined immunodeficiency mice. *Leukemia*, 1998, 12, 1128-1135.

Brouard N, Chapel A, Thierry D, Charbord P, Péault B : Transplantation of gene-modified human bone marrow stromal cells into mouse-human bone chimeras. *J Hemath Stem Cell Res*, 2000, 9, 175-181.

Bulabois CE, Yerly-Motta V, Mortensen BT, Fixe P, Remy-Martin JP, Hervé P, Tiberghien P, Charbord P : Retroviral-mediated marker gene transfer in hematopoiesis- supportive marrow stromal cells. *J Hematother*, 1998, 7, 225-239.

Caplan AI : Mesenchymal stem cells. *J Ortho Res*, 1991, 9, 641-650.

Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI: A quadri-potent mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone and Mineral Res*, 1999, 14, 700-709.

Deschaseaux F, Charbord P : Human marrow stromal cell precursors are alpha1 integrin subunit-positive. *J Cell Physiol*, 2000, 184, 319-325.

Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG : Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol*, 1976, 91, 335-344.

Galmiche MC, Koteliansky VE, Hervé P, Charbord P : Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*, 1993, 82 : 66-76.

Gartner S, Kaplan HS : Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77, 4756-4759.

Gronthos S, Simmons PJ : The growth factor requirements of STRO-1 - positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 1995, 85, 929-940.

Hou Z, Nguyen Q, Frenkel B, Nilsson SK, Milne M, van Wijnen AJ, Stein JL, Quesenberry P, Lian JB, Stein GS : Osteoblast-specific gene expression after transplantation of marrow cells; implication for skeletal gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96, 7294-7299.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96, 10711-10716.

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 1999, 103, 697-705.

Nolta JA, Hanley MB, Kohn DB : Sustained human hematopoiesis in immunodeficient mice by cotransplantation of marrow stroma expressing human interleukin-3 : analysis of gene transduction of long-lived progenitors. *Blood*, 1994, 83, 3041-3051.

Oliver LJ, Rifkin DB, Gabilove J, Hannocks MJ, Wilson EL : Long-term culture of human bone marrow stromal cells in the presence of basic fibroblast growth factor. *Growth Factors*, 1990, 3, 231-236.

Oyama M, Tatlock A, Fukuta S, Kavalkovich K, Nishimura K, Johnstone B, Robbins PD, Evans CH, Niyibizi C: Retrovirally transduced bone marrow stromal cells isolated from a mouse model of human osteogenesis imperfecta (oim) persist in bone and retain the ability to form cartilage and bone after extended passaging. *Gene Therapy*, 1999, 6, 321-329

Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ : Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92, 4857-4861.

Pereira RF, O'Hara MD, Laptsev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, Simon D, Livezey K, Prockop DJ : Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for non hematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95, 1142-1147.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284 : 143-147.

Prockop DJ : Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997, 276, 71-74.

Rémy-Martin JP, Marandin A, Challier B, Bernard G, Deschaseaux M, Hervé P, Wei Y, Tsuji T, Auerbach R, Dennis JE, Moore KA, Greenberger JS, Charbord P. The vascular smooth muscle differentiation of murine stroma. A sequential model. *Exp Hematol*, 1999, 27, 1782-1795.

Saito T, Dennis JE, Lennon DP, Young RG, Caplan AI : Myogenic expression of mesenchymal stem cells within myotubes of mdx mice in vitro and in vivo. *Tissue Engineering*, 1995, 1, 327-343.

Sensebé L, Li J, Lilly M, Crittenden C, Hervé P, Charbord P, Singer JW : Non-transformed colony-derived stromal cell lines from normal human marrows. I. Growth requirement and myelopoiesis supportive ability. *Exp Hematol*, 1995, 23, 507-513.

Simmons PJ, Torok-Storb B : Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, Stro-1. *Blood*, 1991, 78, 55-62.

Wakitani S, Saito T, Caplan AI : Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 1995, 18, 1417-1426.

V

**CELLULES SOUCHES ANGIO-HEMATOPOÏÉTIQUES
(sang et vaisseaux)**

ET

**CELLULES SOUCHES
DE L'ÉPITHÉLIUM RESPIRATOIRE HUMAIN**

Bruno Péault

Directeur de l'Unité INSERM 506
Unité "Ontogenèse des cellules sanguines"
Hôpital Paul Brousse

En amont des cellules souches hématopoïétiques existent vraisemblablement des progéniteurs aussi capables de former l'endothélium des vaisseaux sanguins. La mise en jeu de telles cellules souches angio-hématopoïétiques (parfois appelées hémangioblastes) lors du développement du système sanguin de l'embryon est admise, bien que l'existence au cours de l'ontogenèse normale de tels progéniteurs *strictement restreints* à ces deux lignages n'ait pas encore été formellement démontrée. Celle-ci est néanmoins très fortement suggérée par des caractéristiques anatomiques et moléculaires.

Des arguments très récents mais en nombre croissant suggèrent aussi que des cellules déjà identifiables comme endothéliales, et que l'on peut isoler comme telles par tri automatisé, sont capables de produire en culture des cellules sanguines. On peut rapprocher la suggestion également très récente du potentiel *myogénique* de certaines cellules endothéliales embryonnaires pour émettre l'hypothèse que la paroi vasculaire contient des cellules souches multipotentes. D'une grande importance tant au plan fondamental que thérapeutique, cette notion d'*hémangioblaste* (ou d'endothélium hématopoïétique), qui depuis presque un siècle s'appliquait à des cellules souches restreintes aux stades initiaux du développement sanguin et vasculaire dans l'embryon, sera peut-être bientôt étendue à l'adulte. De telles cellules hémangioblastiques candidates présentes dans la circulation et la moelle osseuse de l'organisme différencié sont actuellement à l'étude. Il a par ailleurs été récemment montré, chez des patients souffrant de leucémie myéloïde chronique, que l'anomalie chromosomique caractéristique de la tumeur était aussi retrouvée dans une population quantitativement significative de cellules endothéliales, suggérant l'origine de la leucémie dans une cellule hémangioblastique ou endothéliale hématogène.

Des cellules souches angio-hématopoïétiques pourraient représenter une nouvelle voie pour les thérapies cellulaire et génique de maladies vasculaires et sanguines. On n'est cependant qu'au tout début des recherches qui permettront de caractériser de telles cellules souches au plan moléculaire, leur sélection, et fonctionnel (tests en culture et *in vivo* chez l'animal) de déterminer :

- Leur distribution spatio-temporelle : dans quels tissus, à quels stades du développement embryonnaire, fœtal et éventuellement post-natal trouve-t-on ces cellules souches ?
- Les conditions de leur stimulation à se multiplier et/ou à se différencier en culture ;
- Leur réel potentiel de différenciation, leur éventuelle capacité à former d'autres dérivés mésodermiques, voire ceux d'autres feuilletts embryonnaires ;
- Leur capacité d'autorenouvellement. La question ne se posait pas alors que l'hémangioblaste n'était considéré que comme une cellule souche éphémère construisant l'ébauche des systèmes vasculaire et sanguin à la fin du premier mois de la gestation humaine. Elle redeviendra fondamentale si l'on confirme que de telles cellules souches sont maintenues jusqu'au stade adulte ;
- Leur greffabilité par voie circulatoire ou intratissulaire.

Il est à noter que le système expérimental des cellules ES cultivées *in vitro* est d'un intérêt particulier dans ce programme de recherche. En effet, c'est dans le modèle de "corps embryoides" dérivés en culture de cellules ES de souris qu'a été faite la démonstration la plus rigoureuse qu'une cellule unique pouvait donner

simultanément une descendance de cellules hématopoïétiques et endothéliales vasculaires. Pour réaliser cette étude, la disponibilité des cellules ES humaines permettrait de déterminer les conditions expérimentales du développement hémangioblastique (facteurs de croissance ou inhibiteurs) et d'en démontrer les mécanismes moléculaires, par description directe puis par analyse expérimentale mettant en jeu le transfert de gènes, selon des méthodes bien établies chez l'animal.

Les épithélia représentent plus de la moitié des tissus du corps humain et y assurent des fonctions diverses. Certains comme dans la peau sont fréquemment renouvelés (cycle complet de 2 mois environ) alors que les épithélia pancréatique et hépatique sont régénérés beaucoup plus lentement. L'épithélium qui tapisse les voies aériennes supérieures (trachée et bronches souches) et distales (bronchioles et alvéoles) est lui aussi renouvelé pendant toute la vie bien qu'à un rythme lent ; il est aussi efficacement réparé dans des pathologies qui l'endommagent telles que l'asthme et la mucoviscidose. Sur cette dernière ont longtemps porté les espoirs de thérapies géniques ; cependant, les résultats ont été décevants car l'on n'a pu viser que les cellules différenciées de l'épithélium, on peut penser que l'on aboutirait à une guérison si l'on pouvait modifier génétiquement ses cellules souches. Au plan pratique la réimplantation de cellules souches de l'épithélium respiratoire pose des problèmes peut-être insurmontables. On peut néanmoins envisager, connaissant la localisation de ces cellules souches, d'y diriger plus précisément le vecteur de transfert et même, si on les a précisément caractérisées, de réaliser un véritable " adressage moléculaire " du gène thérapeutique.

Néanmoins, on ne sait néanmoins pas à l'heure actuelle identifier les cellules souches de l'épithélium respiratoire humain. La structure compacte des épithélia rend très difficile leur caractérisation sur le modèle, par exemple, de celle des cellules hématopoïétiques. Leur approche par cytométrie en flux, technique-clé de l'analyse et du tri cellulaire, pose des problèmes techniques importants : forte adhérence des cellules, marqueurs cytoplasmiques inutilisables. Surtout, l'absence de modèles fonctionnels a longtemps représenté un obstacle majeur à cette caractérisation des cellules souches épithéliales respiratoires, dont la culture *in vitro* bidimensionnelle ne présente qu'un intérêt limité car elle mène à une différenciation partielle, rapide et irréversible, offrant une copie très infidèle du développement normal de la muqueuse.

Des progrès ont été réalisés récemment aux USA et en France avec le développement de modèles xénochimériques aboutissant au développement *ex humano* d'une muqueuse respiratoire humaine présentant un arrangement tridimensionnel normal. Le système de la trachée de rat " humanisée " et greffée dans une souris *nude* permet le développement d'un épithélium pseudostratifié et cilié humain. La transplantation d'ébauches respiratoires fœtales dans la souris SCID permet l'ontogenèse de voies respiratoires humaines intègres et fonctionnelles, incluant également les glandes sous-muqueuses et les structures lymphoïdes associées.

Ayant également largement amélioré l'analyse et le tri des cellules épithéliales respiratoires par cytométrie en flux et en ayant caractérisé les différentes sous-populations à l'aide de molécules membranaires marqueurs, on est actuellement capable dans ces modèles xénochimériques de reconstituer à long terme un épithélium respiratoire humain normal et fonctionnel à partir d'une sous-population triée de cellules épithéliales basales immatures (une autre population incluant des cellules plus matures ne mène qu'à une reconstitution transitoire - moins de 3 mois - de l'épithélium). On ne connaît pas encore les conditions de culture qui permettraient de faire proliférer à l'état indifférencié ces cellules souches candidates, ni leurs éventuels autres potentiels de différenciation.

Ces modèles de xénochimères se prêtent en outre particulièrement bien à l'étude du transfert de gènes dans les tissus respiratoires humains, et permettent aussi bien le développement des tissus mucoviscidosiques que des tissus normaux. Sachant enfin que les tissus respiratoires humains développés dans ces conditions sont fonctionnellement intacts on conçoit que l'on dispose maintenant du dispositif expérimental permettant de tester des thérapies génique et/ou cellulaire, via les cellules souches, d'une pathologie respiratoire telle que la mucoviscidose.

B CELLULES SOUCHES DE LA PEAU ET DE LA CORNEE (KERATINOCYTES, FIBROBLASTES, MELANOCYTES)

I- Yann Barrandon

Directeur de Recherche
Département de différenciation épithéliale
Ecole normale supérieure

II- Jean-Paul Renard

Directeur de Recherche INRA
Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire
INRA

Cellules souches cutanées et thérapie cellulaire

Yann Barrandon

Trois types cellulaires cutanés sont utilisés en thérapie : les kératinocytes, cellules épithéliales responsables du rôle de barrière de la peau, les fibroblastes, cellules mésenchymateuses responsables de la production des fibres de collagène du derme et les mélanocytes responsables de la pigmentation.

Certains kératinocytes, appelés keratinocytes clonogéniques (Keratinocyte colony-forming cells, K-CFCs), sont capables de former des clones en culture. C'est cette propriété qui est utilisée pour fabriquer les épithéliums de culture qui sont transplantés chez les grands brûlés. Les kératinocytes clonogéniques sont présents dans l'épiderme et les follicules pileux.

Les épithéliums de culture autologues permettent de reconstituer de façon permanente la barrière cutanée. De façon surprenante, le tissu conjonctif, présent sous l'épiderme greffé se réorganise progressivement pour ressembler au derme papillaire. Cette régénération du derme superficiel, qui n'est jamais observée lors de la cicatrisation normale, résulte vraisemblablement de la transplantation de fibroblastes dermiques présents dans les épithéliums de culture.

Indications

A - Transplantation de cellules souches autologues

- Traitement des brûlures profondes (kératinocytes)
- Chirurgie plastique et réparatrice (notion de capital "peau") (kératinocytes)
- Ulcères de jambes (kératinocytes)
- Vitiligo (mélanocytes et kératinocytes)
- Cornée (kératinocytes du limbe)

B - Thérapie génique par transplantation de cellules souches autologues transduites

- Génodermatoses très invalidantes (Epidermolyses bulleuses) (kératinocytes)
- Production d'une protéine d'intérêt médical (hormone de croissance, facteur IX, insuline) (kératinocytes et fibroblastes)

C - Thérapie cellulaire avec des kératinocytes et /ou des fibroblastes allogéniques

- Retard de cicatrisation (kératinocytes)

➤ Remplacement de la peau de cadavre (kératinocytes et fibroblastes)

La thérapie cellulaire a permis de sauver des patients grièvement brûlés (au 3ème degré sur plus de 95% de la surface corporelle) (accident du travail, accident domestique, catastrophe). Les meilleurs résultats ont été publiés par l'équipe du Dr Carsin, chef de service du CTB à l'Hôpital Instruction des Armées Percy à Clamart.

La plupart des équipes de recherche travaillant dans le domaine sont spécialisées dans la culture de cellules ou dans la biologie des cellules souches (le plus souvent chez l'animal de laboratoire). A ma connaissance, seules deux équipes au monde ont des compétences reconnues en thérapie cellulaire et en biologie fondamentale des cellules souches cutanées (compétences documentées par des publications de haut niveau) ; ce sont l'équipe du Dr Michele De Luca à Rome et celle du Dr Yann Barrandon à Paris. Nous ne connaissons pratiquement rien du devenir clinique et biologique des épithéliums greffés. Cela est dû à la difficulté à mettre en place des essais cliniques et à la difficulté à suivre les malades à long terme. La mise en place d'essais cliniques nécessite des locaux agréés et des personnels en nombre, condition particulièrement difficile à remplir dans une institution en pénurie chronique. Il faut savoir que les études de recherches clinique et fondamentale ne seront jamais réalisées dans un cadre industriel (expérience américaine, problème de rentabilité, compétence en recherche fondamentale). C'est parce que ces recherches ont été négligées qu'aucun progrès n'a été accompli depuis 1984, date de la publication princeps par le groupe du Pr. Howard Green à Harvard (Gallico et coll., N. Engl J Med. 1984). La seule amélioration, validée par un essai thérapeutique, a été l'introduction d'une matrice de fibrine pour cultiver les kératinocytes (Ronfard et coll., Transplantation, 2000). Face aux difficultés rencontrées par le groupe de Yann Barrandon pour continuer le développement de la technologie "fibrine" en France, le groupe du Dr De Luca (Italie) a pris le relais.

1. Type de modèle cellulaire utilisé et espèce (humaine et/ou animale)

Peau et cornée humaine, souris, rat, lapin
Kératinocytes, fibroblastes, mélanocytes et cellules de Langerhans

2. Quels potentiels de différenciation peut-on obtenir : comparaison cellules souches adultes vs. cellules souches embryonnaires dans votre modèle d'étude ?

Chez la souris : on obtient tous les lignages épithéliaux présents dans la peau à partir de cellules souches adultes

Chez l'homme : on obtient une régénération de l'épiderme et du derme superficiel après transplantation de kératinocytes et de fibroblastes autologues cultivés

3. Capacité de mise en culture des cellules souches adultes vs. cellules souches embryonnaires.

Homme et rat (embryons et adultes) : on cultive sans problème les kératinocytes et fibroblastes souches

Souris (embryons et adultes) : les kératinocytes sont extrêmement difficiles à cultiver. Les fibroblastes se cultivent sans problème

4. Besoins nutritionnels en cultures *in vitro* (type de milieu, facteurs de croissance, etc).

Couche nourricière de fibroblastes de souris irradiés (Swiss 3T3 - J2)
Sérum de veau fœtal, facteur de croissance épidermique (hrEGF)
Les milieux "définis" n'ont jamais permis d'obtenir un résultat clinique

5. Quelles propriétés (morphologiques, cytologiques et/ou moléculaires) s'attachent à l'état de division et de différenciation des cellules de votre modèle d'étude ?

Reconstitution d'un épiderme fonctionnel avec mise en place de façon coordonnée de tous les programmes de prolifération et de différenciation. Idem pour la cornée

6. Destin de ces cellules lors d'un transfert *in vivo* chez l'embryon ou chez l'adulte ?

Homme : Reconstitution d'un épiderme fonctionnel après transplantation autologue chez l'homme

Souris : Morphogénèse cutanée (épiderme, follicules pileux et glandes sébacées) après transplantation dans l'embryon de cellules souches adultes chez la souris

7. Degré de plasticité (trans-différenciation) ?

Oui (attention au terme trans-différenciation)

8. Voies d'accès au tissu-cible chez qui l'on vise à produire un effet régénérateur ?

Biopsie cutanée ou limbique (œil)

9. Utilité des cellules souches mises en œuvre dans votre modèle en thérapie cellulaire et en thérapie génique : comparaison cellules adultes vs. cellules embryonnaires – Type(s) de pathologie(s) humaine(s) susceptibles d'en bénéficier ?

Grands brûlés (plusieurs centaines de malades ont déjà traités par thérapie cellulaire dans le monde entier)

Greffes de cornée
Thérapie génique

- Autologue (génodermatoses très invalidantes type épidermolyses bulleuses, production d'une protéine d'intérêt thérapeutique, chirurgie plastique, troubles de la cicatrisation)
- Allogénique (troubles de la cicatrisation)

Dans l'immédiat pas d'utilité des cellules souches embryonnaires

10. Clonage thérapeutique (potentiel ou effectif).

Pas d'intérêt thérapeutique immédiat.
Grand intérêt en recherche fondamentale

Jean-Paul Renard

1. Type de modèle cellulaire utilisé et espèce (humaine et/ou animale)

Cellules souches pluripotentes embryonnaires de **souris** (ES)

Cellules somatiques différenciées :

-proliférantes : fibroblastes de **souris** et de **bovin**

-postmitotiques : kératinocytes **bovins** (murin en projet)

2. Quels potentiels de différenciation peut-on obtenir : comparaison cellules souches adultes vs. cellules souches embryonnaires dans votre modèle d'étude ?

Nous nous intéressons au potentiel de différenciation des noyaux de ces cellules en les exposant à l'environnement cytoplasmique d'ovocytes énucléées (clonage).

Nous montrons que les noyaux des cellules souches pluripotentes ES, et ceux des cellules somatiques différenciées proliférantes peuvent être remis dans un état totipotent, c'est-à-dire qu'ils sont capables de donner des cellules qui en se spécialisant donneront toutes les cellules de l'organisme.

Par contre, les noyaux des cellules somatiques différenciées post-mitotiques semblent ne pouvoir retrouver qu'un état multipotent et non totipotent

3. Capacité de mise en culture des cellules souches adultes vs. cellules souches embryonnaires.

.

4. Besoins nutritionnels en cultures *in vitro* (type de milieu, facteurs de croissance, etc).

La capacité de se diviser un grand nombre de fois en culture doit être distinguée de la capacité à conserver ou retrouver un potentiel de différenciation.

Les noyaux des cellules souches pluripotentes embryonnaires de souris semblent perdre leur aptitude à retrouver un état totipotent au delà d'une vingtaine de passages. Par contre, les noyaux des cellules somatiques différenciées (bovins) peuvent conserver une aptitude à retrouver un état totipotent après plus de 20 passages.

Ces différences entre types cellulaires pourraient dépendre de conditions de culture (affectant des modifications post-traductionnelles comme par exemple la méthylation de séquences nucléotidiques). Nous tentons, par une approche jusqu'alors empirique, de préciser quels sont les besoins nutritionnels qui sont compatibles avec le maintien de l'aptitude à retrouver un état totipotent. Un de nos objectifs est de partir de lignées "clonales" de cellules donneuses de noyaux (kératinocyte) et de recourir à une approche de génomique fonctionnelle (arrays déjà constitués) pour cribler ces conditions de culture en relation avec la potentialité de développement des noyaux en clonage.

5. Quelles propriétés (morphologiques, cytologiques et/ou moléculaires) s'attachent à l'état de division et de différenciation des cellules de votre modèle d'étude ?

Nous caractérisons l'état de différenciation par la formation d'un épithélium trophoblastique et d'un tissu ectodermique (épiblaste), et pour ce dernier par la formation d'un tissu endo et d'un tissu mésodermique. Ces différents tissus sont aussi caractérisés par une batterie de marqueurs moléculaires classiques.

6. Destin de ces cellules lors d'un transfert *in vivo* chez l'embryon ou chez l'adulte ?

7. Degré de plasticité (trans-différenciation) ?

Les questions que nous posons sont les suivantes :

- quels sont les facteurs ovocytaires qui contribuent à redonner à un noyau de cellule différenciée un état totipotent ?

- ces facteurs ovocytaires sont-ils requis ? Autrement dit, ne pourrait-on pas replacer un noyau dans un état pluripotent par des modifications contrôlées de son environnement cellulaire ?

La maîtrise des techniques de clonage a été une première étape de ce questionnement.

Nous tentons maintenant par une approche associant génomique fonctionnelle, hybridation *in situ* et RNA inhibition de commencer à répondre à la seconde en comparant l'état transcriptionnel de noyaux zygotiques issus de noyaux différenciés à celui de noyaux zygotiques issus d'embryons fécondés *in vivo* ou *in vitro*.

8. Voies d'accès au tissu-cible chez qui l'on vise à produire un effet régénérateur ?

9. Utilité des cellules souches mises en œuvre dans votre modèle en thérapie cellulaire et en thérapie génique : comparaison cellules adultes vs. cellules embryonnaires – Type(s) de pathologie(s) humaine(s) susceptibles d'en bénéficier ?

Le recours aux cellules souches ES de souris nous permet de poser la question suivante :

Les cellules ES issues de blastocystes clonés ont-elles le même potentiel de différenciation *in vitro* que les cellules ES dérivées de blastocystes normaux ?

La réponse à cette question est importante pour une éventuelle utilisation thérapeutique du clonage somatique chez l'homme.

Pour l'instant, nous caractérisons le potentiel de développement *in vivo* de ces blastocystes murins (voir ci-dessous).

10. Clonage thérapeutique (potentiel ou effectif).

Un des principaux résultats du clonage est de montrer que les perturbations de l'environnement nucléaire peuvent n'affecter la capacité de division et de différenciation des cellules qu'une fois celles-ci déjà engagées dans des lignages particuliers. Ainsi, chez la souris et le bovin, les cellules issues de clonage peuvent se différencier apparemment normalement au stade blastocyste mais, *in vivo*, la différenciation et la croissance de certains tissus (comme par exemple le trophoctoderme) sont ensuite altérées.

Nous ne savons pas s'il en est de même *in vitro*. Un premier article publié récemment par un équipe australienne (Munsie et al., *Curr Biol.* 2000 10, :989-92) montre que les cellules "clonées ES" peuvent se diviser en plusieurs dérivés.

11. Autres remarques ou spécifications.

- Il serait important de faire savoir notamment auprès des nombreuses instances qui participent en ce moment à la réflexion concernant la révision des lois de bioéthique de 94 que le terme de cellule souche adulte demeure encore mal défini et qu'il y a plusieurs définitions concurrentes données aux termes de totipotence, multipotence et pluripotence. Ces concepts "flous" permettent le débat scientifique, mais ne peuvent, sans explicitation être utilisés comme caution scientifique.

- J'ai utilisé pour ce texte les définitions données par le NIH même si celles-ci ignorent la distinction entre cellule embryonnaire et cellule somatique, pourtant largement utilisée en Biologie du Développement

C NEURONES FCETAUX

Marc Peschanski

Directeur de l'Unité INSERM U.421

Faculté de Médecine Créteil

1. Type de modèle cellulaire utilisé et espèce (humaine et/ou animale)

Les **allogreffes intracérébrales de neurones fœtaux** ont démontré leur valeur pour le traitement de la **maladie de Parkinson** chez la majorité des quelques centaines de patients qui en ont bénéficié au cours des 10 dernières années. Le besoin d'une thérapie neurochirurgicale (qu'elle soit par greffe neuronale ou par stimulation électrique centrale) intervient lorsque le traitement médicamenteux, d'abord très efficace, provoque des troubles secondaires invalidants (donc chez des patients à un stade déjà évolué). L'allogreffe de neurones fœtaux vise à la substitution de l'innervation dopaminergique défaillante chez les patients par l'implantation dans leur cerveau de cellules très jeunes, donc très plastiques. Les résultats cliniques publiés par la demi-douzaine d'équipes de recherche spécialisées qui ont mené des protocoles scientifiquement solides, vont tous dans le sens d'une nette amélioration de l'état des patients au cours du temps (il faut quelques mois au tissu fœtal pour acquérir les fonctions d'un tissu adulte), lorsque la quantité de tissu implanté a été suffisante, ce que l'on estime aujourd'hui à 3 mésencéphales ventraux complets (3 fœtus) par striatum, soit 6 par patient. Le bilan clinique de cette technique d'application relativement simple étant globalement positif, on pourrait s'étonner de la voir cantonnée depuis 10 ans, dans une poignée de centres de recherche spécialisés. La raison essentielle de l'absence d'expansion de cette technique est sa lourdeur logistique et l'impossibilité dans laquelle on se trouve de s'en décharger sur des partenaires industriels du fait du caractère humain du prélèvement. Comme dans une greffe d'organe, la chaîne de compétences qu'exige le prélèvement fœtal, la dissection de la région cérébrale adéquate et la préparation du tissu pour l'implantation, ne peut être (peuvent ?) commercialisée, donc déléguée.

Le constat de la difficulté logistique qui empêche le développement d'une thérapie pourtant utile potentiellement à des milliers de patients dans notre pays, pousse bien sûr à définir des voies permettant de la contourner. L'objectif poursuivi est précis, puisqu'il s'agit de créer des banques de neurones dopaminergiques fœtaux dans lesquelles les neurochirurgiens n'auraient qu'à puiser la quantité nécessaire à leur intervention.

Deux voies de recherche permettent d'envisager une solution réelle à ce problème. Il s'agit d'une part de l'utilisation de tissu mésencéphalique ventral provenant d'animaux, donc de xéno greffes, et d'autre part de cellules différenciées à partir de cellules souches humaines (allogreffes).

La seule question à laquelle je puisse effectivement répondre, n'étant pas moi-même directement impliqué dans un travail sur les cellules souches, me semble être celle-ci. La discussion autour de l'utilisation de cellules souches à des fins de recherche doit prendre en compte, parmi d'autres aspects, l'utilité thérapeutique spécifique que ces cellules peuvent présenter. Cela revient à poser quelques questions précises : 1. une **thérapie cellulaire efficace** est-elle démontrée chez l'homme ou, pour le moins, fortement suggérée par des approches expérimentales chez l'animal (définition d'un objectif thérapeutique) ; 2. cette approche thérapeutique bénéficierait-elle de la création de "**banques**" de **cellules** dérivées de cellules souches (identification d'un besoin, biologique ou technique) ; 3. parmi les cellules souches, en est-il qui soient à même de répondre au **cahier des charges** requis (caractérisation de la faisabilité scientifique). L'exemple de deux maladies neurodégénératives contre lesquelles une thérapie cellulaire efficace a été mise en oeuvre, les maladies de Parkinson et de Huntington, permet de répondre positivement, d'ores et déjà, aux deux premières questions. Il n'existe pas encore de réponse définitive à la troisième question. Toutefois, quelques éléments de réponse

peuvent déjà être apportés. Tout d'abord, l'utilisation de cellules souches provenant de cerveaux adultes à des fins de prélèvement pour réimplantation semble exclue. En effet, on peut envisager de façon réaliste deux donneurs : le patient à traiter lui-même, et des personnes en état de mort cérébrale. Dans le premier cas, le geste neurochirurgical nécessaire au prélèvement présente un risque considérable (en particulier pour les cellules souches les plus nombreuses, qui sont situées au voisinage immédiat de la paroi ventriculaire que le chirurgien aurait toutes les chances de léser avec des conséquences pathologiques majeures). Dans le second, la probabilité de récupération de cellules souches vivantes dans un cerveau légalement réputé mort depuis 24 heures paraît faible. En théorie, on pourrait imaginer de stimuler le repeuplement des régions affectées par la maladie à partir de cellules souches qui seraient stimulées par voie pharmacologique chez le malade. Il n'existe malheureusement pas, à ce jour, de donnée qui permette de faire passer cette idée de la science fiction à la science tout court et on voit mal autour de quels axes pourrait être lancé un appel d'offres sur le sujet.

Trois autres types de cellules souches pourraient être envisagés, sur la base de résultats déjà publiés. - Des travaux récents, réalisés à partir de cellules souches embryonnaires ES de souris, permettent d'envisager cette source avec optimisme. L'équipe de Ron McKay vient en effet de démontrer qu'une différenciation guidée de ces cellules permettrait d'obtenir un très grand nombre de neurones catécholaminergiques, produisant de la dopamine. Un grand nombre de questions restent bien sûr posées, parmi lesquelles il faut certainement souligner celle de la stabilité génotypique et phénotypique de ces cellules après la greffe, l'intégration anatomique et fonctionnelle des neurones dopaminergiques ainsi créés et la reproduction des résultats à partir de cellules souches embryonnaires ES humaines. Le travail sur les cellules ES humaines est, toutefois, interdit aujourd'hui par les Lois de Bioéthique de 1994, et il faudra attendre la levée de cette interdiction pour entreprendre cette étude.

- Les progéniteurs pluripotents des couches germinatives de l'ectoderme foetal représentent une source de cellules déjà largement étudiées à partir de tissus animaux. De nombreux résultats permettent de penser que ces cellules sont potentiellement différenciables en neurones dopaminergiques, et implantables. L'utilisation de cellules provenant de foetus humains présente l'intérêt de contourner les interdictions légales, puisque le foetus issu d'IVG est considéré comme un individu potentiel "mort" et tombe donc sous le coup des lois gérant les prélèvements d'organes.

- Les cellules-souches stromales de la moelle osseuse sont apparemment moins vraisemblables mais plusieurs articles récents indiquent qu'elles peuvent être guidées vers une différenciation neuronale - ou gliale - et que leur implantation intracérébrale les force vers ce type de différenciation. Il s'agit d'une source cellulaire particulièrement intéressante dans la mesure où elle pourrait être utilisée de façon autologue.

D TISSU MUSCULAIRE SQUELETTIQUE (cellules satellites)

I- Gillian Butler-Browne

Directeur de Recherche à l'INSERM
UMR 7000 du CNRS - Cytosquelette et Développement
Hôpital de la Pitié Salpêtrière

Vincent Mouly

Chargé de Recherche au CNRS
UMR 7000 du CNRS - Cytosquelette et Développement
Hôpital de la Pitié Salpêtrière

II- Didier Montarras

Chef de Laboratoire
Développement cellulaire
Institut Pasteur

Christian Pinset

Directeur de Recherche CNRS
Développement cellulaire
Institut Pasteur

V. Mouly et G. Butler Browne

1- Définitions générales :

La cellule souche, qu'il s'agisse de cellules présentes aux stades précoces (ES et/ou EG), plus tardifs ou après la naissance, représente une réserve susceptible de reformer des tissus lésés ou dégénérés. Il convient de dissocier les différentes cellules utilisables à des fins thérapeutiques selon leurs caractéristiques, en s'appuyant sur les définitions existantes, issues du système hématopoïétique :

- cellules souches vraies : ces cellules présentent deux propriétés. En effet, elles sont diploïdes (exclusion des gamètes) et sont capables d'auto-renouvellement. Ce dernier point est plus complexe qu'il n'y paraît, car ces cellules étant indifférenciées, elles doivent conserver la propriété de donner d'autres cellules (pluripotentes, multipotentes ou unipotentes, voir ci-dessous). D'autre part, elles doivent aussi conserver la même capacité à proliférer afin de ne pas épuiser le système. Nous reviendrons sur ce point, mais on notera qu'une caractéristique qui est apparue récemment concerne la capacité de réguler leur horloge mitotique (l'horloge mitotique détermine le nombre de divisions que fera toute cellule humaine avant d'atteindre la senescence proliférative).
- cellules multipotentes ou pluripotentes : ces cellules sont généralement issues de cellules souches et peuvent donner plusieurs descendance capable d'exprimer des programmes de différenciations distincts selon leur environnement. Cette dernière classe de cellules est plus aisément manipulable que les cellules souches vraies, qui sont très difficiles à isoler et à maintenir dans un système de culture *in vitro*. Par contre, leur horloge mitotique n'est pas nécessairement contrôlée, et donc le nombre de divisions qu'elles peuvent réaliser peut être limité, bien que généralement beaucoup moins que les cellules unipotentes. Enfin, il faut noter que certaines cellules issues de cellules souches ne donneront qu'un nombre très limité, voire un seul type de différenciation (cas de la peau).
- cellules unipotentes : ces cellules sont déjà engagées dans une voie déterminée de différenciation, et présentent toujours une capacité proliférative limitée. Elles sont par contre directement mobilisables pour la réparation du tissu auquel elles appartiennent, contrairement à la majorité des autres types ci-dessus, qui ont besoin de signaux de détermination. Dans le muscle squelettique, il s'agit des cellules satellites, qui sont les seules capables de réparer efficacement les fibres musculaires lésées.

2- Particularités du système musculaire squelettique :

Les cellules de remplacement du tissu musculaire squelettique sont les cellules satellites, qui ne sont pas à proprement parler des cellules-souches. Elles sont immédiatement activées en cas de lésion traumatique ou pathologique, et représentent un moyen de réponse à ces traumatismes très rapide et très efficace, dans la mesure où elles sont déjà déterminées vers la voie de différenciation musculaire. Par contre, leur capacité proliférative, qui diminue avec l'âge et surtout en pathologie dégénérative, reste toujours limitée. Le nombre de divisions disponible reste suffisant pour assurer leur fonction chez un individu "normal" tout au long de sa vie, et ce malgré l'allongement de l'espérance de vie. Par contre, il n'est pas suffisant pour répondre soit à des situations pathologiques ou des cycles de régénération successifs sont nécessaires (maladies génétiques dégénératives), soit à de nouveaux besoins thérapeutiques (thérapie génique à médiation cellulaire (voir paragraphe suivant)). Leur manipulation en culture ne pose *a priori* pas de problèmes, dans la mesure où il s'agit d'un système étudié depuis de nombreuses années et les conditions de culture *in vitro* pour ces cellules ont été bien déterminées, tant chez plusieurs modèles animaux que chez l'homme (en partie par notre équipe dans ce dernier cas).

3- Aspects thérapeutiques :

L'utilisation de cellules exogènes pour reformer un tissu défaillant (réparation) ou pour corriger un défaut génétique est une voie thérapeutique qui fait l'objet de recherche depuis de nombreuses années (voir les travaux pionniers d'A. Caplan dans le domaine osseux et cartilagineux, ou ceux de J. Bernard pour les cellules sanguines). Concernant le muscle squelettique, trois approches sont à considérer :

- Régénération d'un tissu défaillant : c'est ce qui a été proposé récemment par le groupe de Turnbull dans le cas de myopathies mitochondriales dues à une accumulation de mutations dans le génome des mitochondries des fibres musculaires. Une simple étape de régénération permet d'apporter un stock de mitochondries saines issues des cellules satellites et donc de corriger le problème.
- Correction d'un défaut génétique musculaire : de nombreux essais d'injections de myoblastes modifiés ou non chez la souris ont prouvé la validité de cette approche. La capacité proliférative limitée des cellules satellites humaines représente toutefois un obstacle majeur à résoudre, dans la mesure où les cellules doivent être isolées, éventuellement modifiées puis injectées, sachant que cette dernière étape provoque une mort cellulaire massive.

- Production d'un facteur circulant : la démarche, de type usine cellulaire, est envisagée, et par exemple l'équipe d'H. Blau a déjà réussi à faire produire par le muscle, chez la souris, de l'hormone de croissance que l'on peut doser dans la circulation.

Dans tous ces cas de figures, une prolifération limitée par l'horloge mitotique représente chez l'homme un problème qu'il faudra surmonter. L'utilisation récente chez la souris de cellules souches (ou pluripotentes) soit dans des expériences de greffes de moelle (groupes de G. Cossu et F. Mavilio), soit après purification à partir du muscle lui-même (groupes de L. Kunkel et R. Mulligan) a apporté de nouveaux espoirs.

4- Quelques problèmes à résoudre :

Pour résumer brièvement les problèmes posés par la thérapie génique en environnement musculaire, soit on utilise des virus comme vecteurs, ce qui limite pour l'instant la quantité de séquence transférable, pose le problème de ciblage et provoque souvent des rejets immunologiques, soit on utilise les cellules musculaires (satellites ou "souches"). Dans ce dernier cas, l'utilisation des cellules du patient nécessite de les modifier génétiquement et de les réinjecter, ce qui représente une prolifération importante, soit on utilise des cellules de donneurs sains, avec la conséquence d'un rejet probable.

La possibilité de disposer de cellules souches, soit en les isolant à partir des patients, soit en modifiant des cellules satellites pour leur conférer des caractéristiques de cellules souches (manipulation de l'horloge mitotique) représenterait donc une solution possible. Un certain nombre de problèmes reste à régler :

- Le contrôle de la capacité proliférative, qui jusqu'à présent n'a pas été réalisé avant les essais thérapeutiques, ce qui a probablement contribué à leur échec prévisible.

- L'efficacité des cellules souches à participer à la régénération du muscle : dans les deux cas d'exemples cités ci-dessus (transfert de moelle ou purification), les expériences chez la souris ont montré que cette efficacité (inférieure à 1%) restait beaucoup trop faible pour avoir un quelconque effet thérapeutique.

- De telles cellules souches n'ont pas encore été clairement mises en évidence chez l'homme, et l'existence de maladies dégénératives semble indiquer que leur mobilisation n'est pas un phénomène courant, voire prévu dans le fonctionnement normal du muscle squelettique.

- Elles sont réfractaires pour le moment à des manipulations in vitro, particulièrement des amplifications de population cellulaire.

5- Quelques voies de recherche pour résoudre ces problèmes :

Au vu des observations récentes et des problèmes à résoudre, dont la liste présentée au paragraphe précédent n'est probablement pas exhaustive, on peut mieux définir des voies d'approche vers une utilisation thérapeutique du système. Ainsi, si de nombreux marqueurs de surface ont été définis dans le système hématopoïétique, il existe beaucoup moins de données dans d'autres systèmes, particulièrement dans le système musculaire. Tant que nous ne sommes pas capables d'identifier et de purifier les cellules souches, les expériences se cantonnent à des essais empiriques dont l'efficacité est nécessairement très limitée par rapport aux capacités théoriques du système. Les voies d'approche à développer nécessitent des connaissances de base qu'il faut soit améliorer, soit tout simplement acquérir dans les domaines suivants :

- Marqueurs de surface : il existe très peu de marqueurs de surface des cellules satellites (N-CAM qui n'est pas spécifique, M-Cadherine). Il n'en existe aucun pour les cellules souches du tissu musculaire. Celles-ci sont définies pour l'instant *a posteriori* selon des critères fonctionnels, ce qui rend leur identification *a priori* et leur manipulation excessivement aléatoire. Ces marqueurs seront absolument essentiels pour permettre une mise en évidence des cellules souches chez l'homme dans les tissus où ces données manquent, ainsi que pour envisager une purification de ces cellules.

- Facteurs de détermination : on connaît déjà quelques facteurs intervenant de façon précoce dans la détermination des cellules musculaires (Myf5, MyoD), mais ces connaissances doivent encore être améliorées afin de comprendre les événements qui déterminent l'orientation des cellules souches vers un programme ou un autre. Ces connaissances viendront du domaine de recherche sur le développement embryonnaire, et pourront être testées sur les cellules souches précoces (ES ou EG), en attendant que des cellules souches puissent être identifiées et manipulées chez l'adulte.

- Equilibre prolifération/différenciation : La capacité régénérative du tissu musculaire, ou d'autres tissus non prolifératifs, dépendra en partie de la décision des cellules de remplacement de proliférer ou d'entrer dans le compartiment post-mitotique vers la différenciation. Cette décision aura une influence sur la quantité de tissu formé, ainsi que sur le nombre de cellules susceptibles de rester en réserve dans le compartiment à capacité mitotique. Peu de données existent à ce sujet, et l'étude des cellules souches (qui sera ici encore largement dépendante de données venant du développement embryonnaire) apportera beaucoup d'informations dans ce domaine (par exemple les recherches sur des facteurs antagonistes des facteurs de détermination. On peut citer comme exemple simplificateur des gènes de la famille GATA).

- Contrôle du niveau de prolifération : Notre connaissance de l'horloge mitotique a été améliorée par les résultats des recherches sur les séquences télomériques. L'application de ces données aux démarches thérapeutiques n'est pas encore réalisée, mais on peut espérer que ce sera chose faite dans un avenir limité. Par contre, on ne sait pas encore manipuler cette horloge dans des tissus à devenir post-mitotique comme le tissu musculaire ou les cellules nerveuses. Les expériences utilisant des gènes comme celui de la télomérase doivent être continuées et profiter des données concernant la sortie du cycle cellulaire acquises ou à venir.

- Manipulation des cellules souches : Ces cellules étant trop souvent réfractaires à la manipulation en culture (dans la mesure où il s'agit de cellules de réserve, on comprend qu'elles ne soient pas aisément mobilisables), il faut améliorer nos connaissances dans les facteurs nécessaires à leur manipulation *in vitro*. Des conditions de cultures adaptées particulièrement à ces cellules devront être recherchées *de novo*, puisque les conditions actuelles ne sont pas satisfaisantes.

- Tests fonctionnels : Toutes les connaissances acquises selon les voies décrites ci-dessus permettront de mieux connaître les cellules souches. Toutefois, pour pouvoir les utiliser à des fins thérapeutiques, il est essentiel de pouvoir disposer de tests fonctionnels de leur capacité régénérative. Le modèle de souris, déjà largement utilisé, pourra ici encore être très utile. Ainsi, nous utilisons au laboratoire des souris "humanisées" pouvant recevoir des injections de cellules humaines sans rejet immunologique. Ce type d'outil permet de tester les capacités des cellules dans un environnement *in vivo* bien plus proche des réalités thérapeutiques qu'une boîte de culture.

6- Conclusion

Il est clair que plusieurs domaines doivent être mis à contribution pour améliorer nos connaissances et évoluer plus rapidement vers une utilisation thérapeutique. Certains pays, dont il faut bien dire que la part du PIB consacrée à la recherche est bien souvent supérieure à celle de la France, sont déjà en avance sur ce sujet, et la compétition internationale nécessite des efforts accrus. Les cellules souches embryonnaires représentent déjà des modèles d'étude qui permettront de gagner beaucoup de temps, même s'il faut toujours relativiser ce qui est observé sur ce type de modèle. Dans la mesure où peu de modèles de cellules souches ont été décrits et sont manipulables chez l'adulte, il est essentiel de profiter de toutes les possibilités. De même, les connaissances venant du développement embryonnaire et des facteurs précoces se sont déjà révélées très précieuses, et ce domaine doit être largement soutenu. Les cellules souches adultes sont très prometteuses en terme d'outils thérapeutiques, mais malheureusement encore trop peu accessibles pour permettre une avancée rapide dans ce domaine. De plus, le caractère pluripotent des recherches transdisciplinaires qui profiteront de la multiplicité des modèles, y compris les cellules embryonnaires précoces.

Didier Montarras (Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur)
Christian Pinset (Directeur de Recherches au CNRS)

Institut Pasteur- Paris

Notre objectif est de définir des environnements *ex vivo*, basés sur des combinaisons de facteurs de croissance, pour la sélection, l'amplification, et la différenciation de cellules souches. Cette démarche est indispensable pour le développement de la thérapie cellulaire par transplantation.

1 - Types de modèles cellulaires utilisés

Cellules précurseurs des muscles du squelette

2 - Potentiel de différenciation

Ces cellules sont mono-potentes. Elles manifestent, en culture et *in vivo*, la capacité de reformer des fibres musculaires.

3 - Capacité de mise en culture

Ces cellules sont aisément mises en culture. Elles sont dérivées des cellules myosatellites. Les cellules musculaires souches persistent dans les muscles à l'état adulte.

(4-5) - Besoin nutritionnel en cultures et propriétés

Ces cellules peuvent proliférer et se différencier en culture dans des milieux supplémentés avec du sérum. Nous considérons que, à terme (d'ici quelques années), l'usage du sérum devra être éliminé, certainement pour des raisons sanitaires mais aussi pour des raisons de compréhension. Dans ce sens, nous travaillons à la définition de milieux de culture supplémentés avec des combinaisons de facteurs de croissance recombinants. Nous avons déjà élaboré des stratégies "recettes" qui permettent la prolifération prolongée et la différenciation de cellules précurseurs des muscles du squelette d'origine murine et humaine.

6 - Destin des cellules réimplantées

De nombreuses réimplantations de cellules précurseurs des muscles ont été effectuées chez l'animal. Ces cellules sont couramment réimplantées directement dans les muscles par injection à la seringue.

Le destin de ces cellules est double : La majorité d'entre elles meurent dans les 24 h qui suivent. Une minorité de cellules persiste et manifeste la capacité de coloniser des fibres musculaires dans les semaines qui suivent. Les raisons de cette mort massive et rapide sont incompréhensibles. Le nombre de cellules transférées souvent élevé (plusieurs millions) et l'état cellulaire influencé par les conditions de culture pourraient être en cause. Ce sont des questions que nous étudions.

7 - Plasticité

La transdifférenciation de ces cellules est possible. Elles peuvent adopter un destin adipocytaire ou ostéogénique. Ce dernier se manifeste lorsque les cellules sont cultivées sur matrice osseuse ou traitées par du BMP (bone morphogenetic factor).

8 - Voie d'accès au tissu cible

Injection directement dans le muscle.

9 - Utilité des cellules précurseurs des muscles du squelette dans une démarche thérapeutique.

C'est le type cellulaire le plus adapté pour la réparation des muscles du squelette pour sa capacité répliquative et son caractère monopotent.

Ce type cellulaire pourrait être adapté à la réparation d'autres tissus tels que le muscle cardiaque et certains sphincters. Des essais dans ce sens sont entrepris par plusieurs équipes en France et à l'étranger. Une équipe française a réalisé cette année (été 2000) la première greffe autologue de cellules musculaires dans le coeur d'un patient atteint d'un infarctus.

10, 11-Commentaire général.

L'exposé succinct qui précède traite des cellules précurseurs des muscles du squelette en tant que type cellulaire prédominant dérivé des cellules myosatellites responsables de la régénération musculaire.

Actuellement toutes les démarches de thérapie cellulaire s'appuient sur des cellules souches ou précurseurs, au potentiel restreint. Ces cellules proviennent du tissu que l'on cherche à réparer et leur destin est en quelque sorte déjà fixé.

Récemment, la présence de cellules souches, au potentiel plus large, a été décrite dans plusieurs tissus adultes, muscle du squelette, moelle osseuse, système nerveux central. Le destin de ces cellules dépendrait de leur site de réimplantation.

Aujourd'hui, maîtriser l'isolement, l'amplification et le contrôle du devenir de ces cellules souches, mais aussi des cellules souches embryonnaires (animales et humaines) est sans aucun doute un objectif majeur. Pour atteindre cet objectif il est indispensable de faire de la culture cellulaire, une technologie. Il va s'agir d'éliminer des milieux de culture, les sérums animaux qui constituent encore aujourd'hui la principale source de facteurs de croissance. Ces sérums devront être remplacés par des cocktails de facteurs de croissance recombinants. Définir les combinaisons de facteurs de croissance, requises pour gouverner l'engagement d'une cellule souche dans différents lignages, est une tâche essentielle.

Les mots clés : amplification *ex vivo*, facteurs de croissance, contrôle de la plasticité, thérapie cellulaire.

La biologie du développement bénéficiera de ces travaux. De nouvelles démarches de thérapie cellulaire pourront aussi naître.

E “ CELLULES SOUCHES ” HEPATIQUES (hépatocytes fœtaux et embryonnaires)

Anne Weber
Directeur de Recherche
INSERM E.M.I. 00-20
Hôpital Bécclère

Préambule :

Mon équipe ne travaille pas sur les cellules ES ni sur les cellules souches adultes, qui dans le foie - si elles existent –sont considérées comme “ en réserve ” et qui ne peuvent pas être mises en évidence dans un foie normal, mais sur les hépatocytes fœtaux et embryonnaires, sachant que dans ces derniers aux stades précoces de développement existent les hépatoblastes, cellules souches bipotentes précurseurs des hépatocytes et des cellules biliaires.

1. Type de modèle cellulaire utilisé et espèce (humaine et/ou animale)

Hépatocytes fœtaux et embryonnaires de primate et humain

2. Quels potentiels de différenciation peut-on obtenir : comparaison cellules souches adultes vs. cellules souches embryonnaires dans votre modèle d'étude ?

Cf préambule : la cellule souche hépatique fait l'objet d'un long débat qui dure depuis 1958.

Les 4 grands laboratoires américains qui travaillent sur le sujet sont maintenant d'accord (opinion que je partage) pour dire qu'elle existe et est stimulée à proliférer dans les conditions de stress toxique du foie chez le rat (CCl4, galactosamine) et après administration de certains carcinogènes chimiques (mais pas tous). J'ai démontré la présence de ces “ putatives ” cellules (dites cellules ovales) dans un modèle de souris transgénique pour T de SV40 sous contrôle d'un promoteur hépato-spécifique et développant spécifiquement des hépatocarcinomes.

Ces cellules expriment effectivement des marqueurs biliaires et hépatocytaires.

Chez l'homme elles sont recherchées dans les cirrhoses en phase terminale par marquage immuno-histochimique mais non formellement prouvées et encore moins isolées .

Nous avons immortalisé des hépatocytes simiens fœtaux qui expriment des cytokératinocytes biliaires et hépatocytaires et semblent se comporter comme des hépatocytes après transplantation dans des souris nude. La même approche est en cours avec des hépatocytes embryonnaires humains.

D'après le modèle des cellules ES de souris, la différenciation vers des types hépatiques n'a, à ma connaissance, jamais été obtenue (mais je peux me tromper).

3. Capacité de mise en culture des cellules souches adultes vs. cellules souches embryonnaires.

Nulle car les seules cellules “ ovales ” isolées le sont à partir de foies transformés

4. Besoins nutritionnels en cultures *in vitro* (type de milieu, facteurs de croissance, etc).

Les hépatocytes fœtaux et embryonnaires prolifèrent spontanément pendant quelques divisions mais nous sommes en train de tester plusieurs facteurs ;

5. Quelles propriétés (morphologiques, cytologiques et/ou moléculaires) s'attachent à l'état de division et de différenciation des cellules de votre modèle d'étude ?

Au cours de la différenciation des hépatocytes il existe une séquence d'activation de facteurs de transcription (HNF4, 3 .) mise en évidence chez la souris et le rat, que nous souhaitons caractériser chez l'homme. Il en est de même des protéines impliquées dans la polarisation qui est un gage de fonctionnalité de ces cellules.

6. Destin de ces cellules lors d'un transfert *in vivo* chez l'embryon ou chez l'adulte ?

Les hépatocytes embryonnaires sont en cours de réimplantation chez la souris adulte ; au stade où nous savons les isoler actuellement (8-15 semaines) ils donneront naissance à des hépatocytes.

7. Degré de plasticité (trans-différenciation) ?

Il vient d'être démontré que les cellules souches hématopoïétiques pouvaient, dans certaines conditions, participer à la reconstitution du foie chez la souris et le rat.

8. Voies d'accès au tissu-cible chez qui l'on vise à produire un effet régénérateur ?

Injection via la veine porte ou directement dans le parenchyme hépatique chez le singe fœtal ou nouveau-né.

9. Utilité des cellules souches mises en œuvre dans votre modèle en thérapie cellulaire et en thérapie génique : comparaison cellules adultes vs. cellules embryonnaires – Type(s) de pathologie(s) humaine(s) susceptibles d'en bénéficier ?

Correction de maladies métaboliques hépatiques en thérapie génique et cellulaire.

Les cellules adultes, par exemple provenant de la moelle, semblent une approche prometteuse.

10. Clonage thérapeutique (potentiel ou effectif).

Pour reconstituer un tissu mais un organe aussi complexe que le foie.. ?

**F ASPECTS ETHIQUES DE LA RECHERCHE SUR LES CELLULES SOUCHES HUMAINES : MYTHES
ET REALITES**

Alain Pompidou
Professeur
Service d'Histologie
Faculté de Médecine Cochin

ASPECTS ETHIQUES DE LA RECHERCHE SUR LES “ CELLULES SOUCHES ” HUMAINES : MYTHES ET REALITES

Il importe de rappeler trois principes reconnus dans la plupart des pays européens :

- l'interdiction du clonage à des fins de reproduction ;
- l'interdiction de la production d'embryons à des fins de recherche (discutable pour les Britanniques qui ont autorisé le clonage d'embryon humain à des fins de recherche thérapeutique) ;
- l'interdiction d'expérimentations sur les cellules germinales.

Deux autres principes éthiques doivent être **absolument** respectés :

Premièrement les règles de sécurité élémentaire : il s'agit de vérifier l'absence de contaminants biologiques : prion, virus, agents micro-bactériens susceptibles d'effets secondaires ou indésirables.

Deuxièmement, dans le cadre du respect d'un principe de précaution proportionné, il importe de mener les expérimentations préalables nécessaires afin de tenter de prévoir les effets à court, moyen et long terme de l'utilisation thérapeutique de lignées cellulaires (en phase de multiplication, immortalisées ou transformées par tout agent de construction inducteur de différenciation cellulaire).

Ceci implique la greffe des lignées cellulaires utilisées à des fins de thérapies dites “ régénératives ” sur des souris immuno-déprimées (NUDE, SCID “ naturelles ” ou “ humanisées ”).

Les problèmes se posent différemment suivant le stade de développement au cours duquel les “ cellules souches ” sont prélevées.

a) Pour le stade embryonnaire :

Il importe de distinguer :

- le prélèvement pré-implantatoire de cellules de type blastomérique, de cellules de la morula ou du blastocyste (cellules du bouton embryonnaire)
- le prélèvement immédiatement post-implantatoire (deuxième, troisième semaine) est, en règle générale, irréalisable chez l'homme.

b) Le prélèvement post-embryonnaire

Il est possible à partir de la fin de la quatrième semaine (sixième semaine d'aménorrhée).

c) Le prélèvement fœtal

Il est possible à partir du deuxième mois sur des produits de fausses couches spontanées ou d'IVG ou d'IMG ou d'ITG.

d) Les prélèvements post-nataux

Ils posent le problème chez l'enfant de l'accord parental ou de son représentant légal, chez l'adulte, celui du consentement informé. Dans le cas du prélèvement de “ cellules souches ” à des fins de recherche thérapeutique, une explication compréhensible et sans parti pris devra être fournie en tenant compte des objectifs de transformation des “ cellules souches ” initiales en cellules différenciées ainsi que des éventualités de réalisation de lignées cellulaires humaines et de greffe chez la souris susceptible de réaliser des tissus chimériques.

Indépendamment du stade de prélèvement des “ cellules souches ”, il importe d’identifier avec précision s’il s’agit :

- de cellules totipotentes (cellules blastomériques obtenues après fécondation sexuée par clonage de cellules embryonnaires ou après reproduction asexuée par clonage de cellules somatiques (par transfert nucléaire dans un ovule énucléé))
- de cellules pluripotentes : cellules souches de lignée cellulaire, telles que les cellules hématopoïétiques (obtenues chez le fœtus ou après la naissance)
- de cellules indifférenciées susceptibles de transdifférenciation, par exemple, transformation de cellules nerveuses en cellules hématopoïétiques et vice et versa.

Quel que soit le type de cellules, il importe également de préciser si celles-ci sont destinées à être soumises à des tentatives de multiplication, voire d’immortalisation ou de différenciation, isolément ou successivement (la multiplication pouvant être tentée à nouveau en vue de l’expansion de clones cellulaires ou de lignées de cellules différenciées).

Les **problèmes éthiques** qui risquent de se poser sont ceux liés aux conséquences de telles manipulations, en particulier sur les cellules embryonnaires qui peuvent donner naissance à des cellules germinales.

L’utilisation de facteurs sériques, de vecteurs ou de gènes de prolifération ou de différenciation posera rapidement le problème de leur brevetabilité et de l’appropriation éventuelle des mécanismes fondamentaux de biologie cellulaire.

Les perspectives de thérapies dites “ régénératives ” (appliquées aux traitements de la mucoviscidose, des grands brûlés, du diabète, des maladies cardio-vasculaires ou neuro-dégénératives, des myopathies) justifient néanmoins l’utilisation des cellules souches embryonnaires ou prélevées chez des fœtus ainsi qu’après la naissance, sous réserve de **respecter les règles de sécurité élémentaires** énoncées ci-dessus, tant sur le plan de la non-contamination éventuelle que sur celui de l’évaluation des effets à court, moyen ou long terme.

Plutôt que la fabrication, par clonage, d’embryons humains destinés à être utilisés à des fins de recherche, l’utilisation d’embryons humains congelés ayant perdu toute perspective de projet parental paraît plus acceptable dans la mesure où tout risque d’implantation est exclu et où l’utilisation des “ cellules souches ” permet la réalisation de lignées cellulaires plus ou moins différenciées, à haut potentiel thérapeutique.

Il en est de même pour l’utilisation des cellules souches obtenues largement après l’implantation dans la muqueuse maternelle humaine, c’est-à-dire, au stade fœtal ou après la naissance.