



HAL
open science

Applications médicales et pharmaceutiques des cellules souches pluripotentes : vers un changement de paradigme ?

Jérôme Alexandre Denis

► **To cite this version:**

Jérôme Alexandre Denis. Applications médicales et pharmaceutiques des cellules souches pluripotentes : vers un changement de paradigme ?. Sciences du Vivant [q-bio]. Université René Descartes - Paris V, 2011. Français. NNT: . tel-00637075

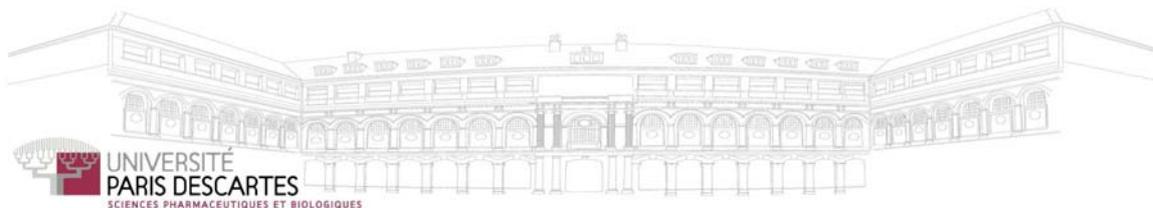
HAL Id: tel-00637075

<https://theses.hal.science/tel-00637075>

Submitted on 30 Oct 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



MÉMOIRE

DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES

De Pharmacie Spécialisée

Soutenu le Jeudi 27 Octobre 2011

Par Monsieur Jérôme Alexandre DENIS

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de:

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Applications médicales et pharmaceutiques des cellules souches pluripotentes :
vers un changement de paradigme ?**

JURY

Président : Monsieur le Professeur Jean-Marie LAUNAY

Membres : Monsieur le Professeur Philippe MANIVET

Madame le Docteur Christelle LAGUILLIER-MORIZOT

Monsieur le Professeur Sylvain LORIC



Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement;*
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement;*
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



Ordre national
des pharmaciens

Remerciements

L'internat est une formation universitaire mais c'est avant tout une aventure humaine particulièrement enrichissante. J'ai pu tout au long de ces (nombreuses !) années rencontrées plusieurs personnes que je tiens à remercier particulièrement. Tout d'abord les membres de mon jury de thèse qui m'ont fait l'honneur d'accepter mon invitation et qui m'ont suivi et formé pendant mon séjour prolongé, notamment à Lariboisière.

- le **Professeur Jean-Marie LAUNAY**, chef de service de biochimie et de biologie moléculaire du CHU Lariboisière-Fernand Widal qui m'a accueilli dans son service, toujours soutenu dans mes démarches et surtout grandement facilité l'adéquation entre mes activités d'internes et mes activités de recherche.
- le **Professeur Philippe MANIVET** avec qui nous avons eu de longues et fructueuses discussions scientifiques dans le couloir (parfois très tard le soir) et qui vont finalement probablement aboutir sur quelque chose de concret. Une de ces idées un peu « folle » mais au combien séduisante !!!
- le **Docteur Christelle LAGUILLIER-MORIZOT**. Nous nous sommes rencontrés à Lariboisière et nous avons partagé les joies de la vie d'interne. Merci d'avoir accepté mon invitation à participer à ce jury de haut vol et très fier d'être ton premier étudiant !!!
- le **Professeur Sylvain LORIC**. Merci d'avoir accepté mon invitation et en espérant que nous continuerons à travailler ensemble dans l'avenir en particulier sur la thématique des « cellules souches » qui nous intéresse tous les deux.

Je remercie également les personnes qui m'ont formé au cours de ma thèse de Sciences à Evry : le Dr. Marc Peschanski, le Dr. Geneviève Piétu et le Dr. Cécile Martinat ainsi que tout le laboratoire I-Stem en particulier, jackie, laetitia, delphine, karine, sophie, morgane, yves et les autres...

Je remercie aussi certaines personnes rencontrées à Lariboisière qui sont devenu des ami(e)s notamment Delphine Bonnefond et Delphine Gonzales, Leslie, Christelle ainsi que l'équipe de garde dans son ensemble en particulier les jeunes ! : Achour, Leïla et Marion et Mohamed Yacoubi pour toutes ces gardes passés ensemble...

Merci également à mes amis de promo : Stéphanie, Sonia, Philippe, Jehanne, Delphine, Momo, Yacine, Lisa, Lina, Marina...

Enfin, je remercie mes parents et mon frère Damien pour leur soutien ...sans oublier ma copine Marie-Laure : merci de me supporter !

Table des matières

Revue bibliographique	8
Premier chapitre : Les cellules souches : définitions, propriétés et mécanismes biologiques	9
1. Définitions	9
2. Les cellules souches pluripotentes	12
2.1. Les différents types de cellules souches pluripotentes	12
2.2. Origine et dérivation des cellules souches pluripotentes.....	12
2.2.1. Les cellules souches embryonnaires (ES)	12
2.2.2. Les cellules souches germinales (EGCs)	15
2.2.3. Induction expérimentale de la pluripotence.....	15
2.3. Bases moléculaires de l'identité des cellules pluripotentes humaines	21
2.3.1. Réseaux de régulation génique.....	22
2.3.2 Régulation épigénétiques	24
2.3.3. Régulations par les microARNs.....	27
2.3.4 Intervention des facteurs extrinsèques	30
2.4 Manipulation <i>in vitro</i> des cellules hES	33
2.4.1 Morphologie	33
2.4.2 Maintien expérimental de l'état d'indifférenciation en culture	34
2.4.3 Passage des cellules.....	36
2.4.4 Marqueurs phénotypiques	37
2.4.5 Recherche d'anomalies caryotypiques ou génomiques	37
2.4.6 Activité télomérasique.....	38
2.4.7. Démonstration du caractère pluripotent	38
2.5 Différenciation des cellules ES	33
2.5.1 Différenciation spontanée et formation de corps embryoides.....	39
2.5.2 Différenciation guidée.....	39
2.5.2.1 Différenciation vers le lignage ectodermique	42
2.5.2.1.1. Différenciation neurale	42
2.5.2.1.2 Différenciation épidermique	45

2.5.2.1.3 Différenciation vers les crêtes neurales.....	47
2.5.2.2. Différenciation mésodermique et endodermique	49
Second chapitre : Intérêts médicaux et pharmaceutiques des cellules souches pluripotentes	53
1. Thérapie cellulaire.....	54
1.1. Principe et état d'avancement des applications des cellules souches en thérapie cellulaire.....	54
1.2 Thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des cellules pluripotentes.....	56
1.3 Place des cellules iPS en thérapie cellulaire	57
2. Applications dans l'industrie pharmaceutique.....	59
2.1 De l'hypothèse scientifique à la cible moléculaire, la modélisation pathologique.	66
2.1.1 Modélisation pathologique des maladies génétiques.....	61
2.1.1.1 Les cellules hES normales modifiées par génie génétique.....	61
2.1.1.2 Les lignées de cellules ES mutantes porteuses d'anomalies génétiques	62
2.1.1.3 Les cellules souches induites à la pluripotence spécifique de patients.....	64
2.2 De la cible moléculaire à la molécule « hit », le criblage à haut débit.....	66
2.3 De la molécule « hit » au médicament, étude pré-clinique et clinique	67
2.3.1 Modèles cellulaires utilisant des hépatocytes dérivés de cellules pluripotentes.....	68
2.3.2 Modèles cellulaires utilisant des cardiomyocytes dérivés de cellules pluripotentes	69
2.3.3 Détermination de la tératogénicité.....	70
2.4 Du médicament pour tous au médicament personnalisée	70
3. Applications en recherche fondamentale	71
3.1 Compréhension des mécanismes de différenciation.....	71
3.2 Etude du processus umorigène.....	73
Discussion	77
1. Problèmes éthiques, juridiques et commerciaux concernant les applications des cellules souches pluripotentes.....	77
2. Problèmes scientifiques et verrous technologiques des cellules souches pluripotentes.....	82
3 Problèmes spécifiques concernant l'utilisation des cellules souches pluripotentes en thérapie cellulaire.....	85
4. Problèmes posés par l'utilisation des cellules souches pluripotentes en tant que modèle cellulaire.....	89
Conclusion	94
Bibliographie.....	95

Avant-propos

Le Diplôme d'études spécialisées de pharmacie spécialisée a ceci de particulier qu'il permet aux internes d'investir de nouvelles disciplines scientifiques résolument tournées vers l'innovation et la recherche dans lesquelles le pharmacien aura vraisemblablement un rôle important à jouer dans l'avenir, au service de la santé publique.

Ce mémoire est l'occasion de faire un état des lieux sur une découverte majeure de la biologie cellulaire de ces dernières années, qui a été au centre de mes activités de recherche réalisées au cours de mon cursus d'internat. En effet, la découverte de la possibilité d'induire de manière expérimentale la propriété de pluripotence à partir théoriquement de n'importe quelle cellule somatique, est une véritable révolution conceptuelle mais c'est aussi une avancée technologique extrêmement importante puisqu'elle augure des applications majeures autant pour la médecine de demain que pour l'industrie pharmaceutique. Les cellules souches embryonnaires humaines (hES), dérivées des tous premiers stades de l'embryon ou les cellules souches induites à la pluripotence obtenues par reprogrammation à partir de cellules différenciées (hiPS) possèdent des propriétés uniques d'auto renouvellement et de pluripotence permettant d'une part de disposer d'une quantité théoriquement infinie de matériel biologique et d'autre part d'imaginer pouvoir obtenir toutes les cellules de l'organisme en guidant de manière appropriée leur différenciation. Ainsi, ces cellules rendent possible -du moins conceptuellement- l'un des rêves de la médecine moderne celui de pouvoir remplacer des cellules « malades » ou vieillissantes de l'organisme par des cellules plus « jeunes » et saines.

Pour une question aussi universelle que celle-ci, nous tenterons dans ce mémoire de distinguer ce qui relève de la réalité scientifique plutôt que de la science-fiction, elle même largement inspirée par l'imagination populaire.

Comme nous le verrons, même si la thérapie cellulaire utilisant les cellules souches pluripotentes (hES) est aujourd'hui une réalité puisque plusieurs essais cliniques ont débuté ces trois dernières années dans des applications aussi spectaculaires et médiatiques que la réparation de lésions médullaires chez le patient paralysé ou les tentatives visant à réparer les conséquences causés par la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Toutefois, ces biotechnologies sont encore récentes et de nombreux problèmes sont toujours en cours

d'expertise laissant penser que cela prendra vraisemblablement encore du temps. En revanche, certaines applications telles que l'utilisation de ces cellules comme modèles utiles pour la recherche médicale, notamment pour mieux comprendre certaines maladies telles que les maladies monogéniques ou encore dans le cycle de recherche de nouveaux médicaments en font des ressources précieuses immédiatement applicables à un large panel d'applications pour l'industrie pharmaceutique.

Le travail présenté dans ce mémoire consiste dans une première partie à introduire la thématique en revenant sur les définitions, les caractéristiques et les propriétés biologiques principales des cellules souches dites pluripotentes en particulier les cellules souches embryonnaires humaines (hES) et les cellules souches induites à la pluripotence (hiPS). Puis, dans une seconde partie, les principales applications de ces cellules sont illustrées par des exemples d'actualité. Enfin, la dernière partie du manuscrit est consacrée à discuter plus précisément de certains points techniques qui représentent probablement les principaux verrous technologiques actuels en mesure de limiter l'expansion de ces technologies. De même en marge de l'aspect purement scientifique, ces cellules font également l'objet de controverses et de discussions éthiques, juridiques et économiques dont il est important de tenir compte pour comprendre les enjeux futurs de ces recherches, en particulier pour les professionnels de santé.

Revue bibliographique

Premier Chapitre :

Les cellules souches : définitions, propriétés et mécanismes biologiques

1. Définitions

Les cellules souches du terme anglo-saxon « stem cells » sont des cellules qui ont la propriété de se diviser théoriquement de manière illimitée -ou du moins un très grand nombre de fois- de manière physiologique, par opposition aux cellules cancéreuses qui acquièrent cette propriété au cours d'un processus pathologique. Ce phénomène est appelé auto-renouvellement (« *self-renewal* » en anglais). Il signifie que les cellules se divisent de façon à donner au moins une cellule fille identique à la cellule d'origine en conservant toutes ses propriétés génétiques et épigénétiques. Il y a alors maintien ou amplification du réservoir cellulaire. Sur les bases de cette première définition, il existe différents types de cellules souches se définissant par leurs potentialités de différenciation qui se restreignent au cours de la vie d'un individu (**Figure 1**).

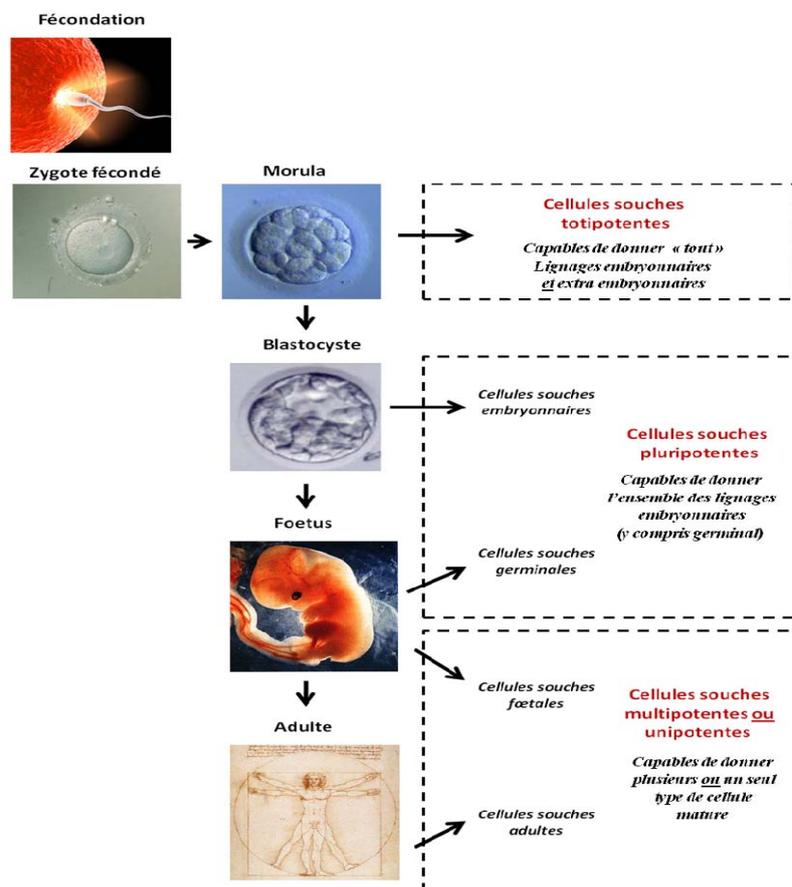


Figure 1 : Potentialités de différenciation des cellules souches au cours de la vie.

Après la fécondation, le zygote et la morula sont constitués de cellules dites totipotentes, c'est-à-dire capables de donner l'ensemble des lignages embryonnaires et extra-embryonnaires.

Les cellules souches embryonnaires isolées de l'embryon au stade blastocyste sont dites pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de donner tous les lignages embryonnaires, y compris germinales, mais pas les annexes extra-embryonnaires. Les autres types de cellules souches présentes dans les tissus embryonnaires, fœtaux ou adultes sont appelés cellules souches adultes ou tissulaires. Certaines d'entre elles gardent des capacités de différenciation importantes et on parle de multipotence si elles sont capables de générer au moins quatre progénies différentes. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) et les cellules souches hématopoïétiques (CSH) représentent les deux exemples les mieux décrits. Les premières sont capables de générer des chondrocytes, des ostéocytes, des adipocytes et des cellules du muscle lisse (Delorme, Ringe et al. 2009). Les secondes sont capables de générer entièrement le lignage hématopoïétique (érythroblastique, mégacaryocytaire et lymphoïde), ce qui a été démontré par leur capacité à reconstituer les propriétés hématogènes de la moelle osseuse après aplasie médullaire (Peters, Cornish et al., 2010). D'autres cellules souches ont des capacités de différenciation encore plus restreintes, c'est-à-dire capables de donner deux ou trois progénies. C'est par exemple le cas des cellules souches chondro-ostéogéniques de la moelle osseuse (Beresford, 1989; Caplan, 1997; Owen, 1988; Owen, 1988; Prockop, 1997) ou des cellules souches du bulbe folliculaire du cheveu qui sont épidermiques mais aussi les glandes sébacées (Jaks, Kasper et al.; Ohshima 2007). Enfin, certaines cellules souches sont dites unipotentes. Elles sont capables de se différencier uniquement dans un seul type de cellules spécialisées. C'est le cas par exemple des cellules satellites du muscle squelettique qui permettent la régénération partielle du muscle après un traumatisme (Collins, Olsen et al. 2005; Relaix and Marcelle 2009) ou encore des cellules de l'épithélium basal de la muqueuse intestinale responsables de l'auto-renouvellement rapide du tissu tapissant le tube digestif (Barker, van de Wetering et al., 2008).

Dans l'organisme adulte, les cellules souches sont rares -de l'ordre de une pour un million- et sont localisées dans des régions précises que l'on appelle « niches » présentes dans des tissus à régénération rapide. Celles-ci représentent un microenvironnement physique et chimique qui permet le maintien de leurs identités et la prolifération de ces cellules (Moore

2. Les cellules souches pluripotentes

2.1. Les différents types de cellules souches pluripotentes

Historiquement, le concept de pluripotence est relativement ancien et provient des travaux réalisés sur les tératocarcinomes de souris. Ces tumeurs se développent dans les gonades et sont constituées d'un agglomérat désorganisé de cellules ectopiques d'origines diverses comprenant par exemple du muscle, du cartilage ou du tissu neural. Dès 1964, ces cellules indifférenciées ont été identifiées comme à l'origine des multiples types tissulaires observés. Elles furent appelées cellules carcinomales embryonnaires et firent l'objet de nombreuses recherches dans les années 1970 (Martin 1980). Pendant longtemps, ces cellules ont été considérées comme pluripotentes mais cette propriété n'a pas été confirmée. En effet, lorsqu'elles sont injectées dans un blastocyste, elles participent au développement de l'embryon mais leurs progénies ne sont retrouvées que dans certains des tissus du souriceau - dit chimériques - mais pas dans les gamètes. Ces cellules que certains utilisent encore, comme la lignée N-tera2, peuvent néanmoins participer à la compréhension des mécanismes qui dirigent la différenciation cellulaire (Andrews 1998). Aujourd'hui, la source principale de cellules souches pluripotentes reste l'embryon au tout début de son développement permettant l'établissement de lignées de cellules souches embryonnaires (ES). Cependant, la possibilité récente de reprogrammation de cellules somatiques en cellules induites à la pluripotence (iPS) par réexpression forcée de certains facteurs de transcription a ouvert de nouvelles perspectives que l'on discutera également dans ce manuscrit.

2.2. Origine et dérivation des cellules souches pluripotentes

2.2.1. Les cellules souches embryonnaires (ES)

Chez l'Homme, au cours du développement précoce de l'embryon, la segmentation ou clivage fait directement suite à la fécondation. Elle dure quatre jours et donne naissance à une petite masse de même taille que le zygote, que l'on appelle morula, composée de quelques dizaines de cellules, les blastomères. A ce stade, tous les blastomères ont un aspect identique mais il y a déjà une détermination : les blastomères périphériques sont destinés à devenir le trophoblaste (annexe extra-embryonnaire placentaire), alors que les blastomères centraux constituent la masse cellulaire interne (MCI) à partir de laquelle se formera l'embryon lui-même. Le 5^{ème} et le 6^{ème} jour, la blastulation fait suite au clivage pour former le blastocyste.

A ce stade, une cavité se forme à l'intérieur de l'embryon, c'est le blastocèle (**Figure 3**).

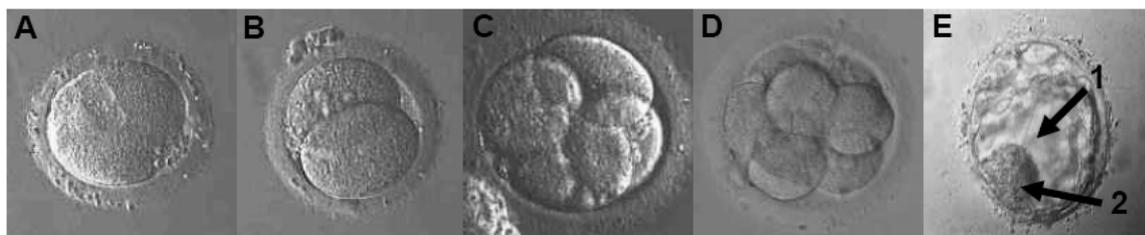


Figure 3 : Description du développement précoce de l'embryon humain au cours de la première semaine.

(A) Zygote après fécondation. (B) Première mitose de segmentation, l'embryon est au stade de 2 cellules. (C) Deuxième mitose de segmentation conduisant à la formation du stade 4 cellules. (D) Embryon au stade Morula. Au 3ème jour, les limites cellulaires sont parfaitement visibles et les blastomères peuvent être séparés mécaniquement les uns des autres. (E) Blastocyste (4ème jour) présentant une cavité centrale, le blastocèle (1) et à un de ses pôles, la masse cellulaire interne (2).

Il sépare le trophoblaste de la MCI, excepté à l'un des pôles de l'embryon qui devient le pôle embryonnaire. C'est dans cette MCI que l'on trouve les cellules ES mais seulement pendant une très courte période de temps, en moyenne entre 5 jours $\frac{1}{2}$ et 7 jours $\frac{1}{2}$ après la fécondation. Ce sont ces cellules qui sont capables de générer l'ensemble des lignages somatiques et germinaux de l'embryon.

Le procédé qui consiste à isoler les cellules ES à partir de la MCI afin d'établir une lignée cellulaire stable est appelé dérivation. Ce processus a été décrit simultanément pour la première fois chez la souris en 1981 par deux équipes indépendantes, l'une britannique dirigée par Sir Martin John Evans (Prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 2007) et Matthew H. Kaufman à l'Université de Cambridge et l'autre américaine dirigée par Gail R. Martin à l'Université de Californie à San Francisco. Les cellules ES sont isolées à partir de la MCI à l'aide d'une réaction immunitaire qui sera détaillée plus loin. Pendant les 15 années qui suivirent, ce procédé a été utilisé avec succès dans de nombreuses espèces mais toujours pas chez l'Homme. Un premier papier publié en 1994 faisait l'état de la possibilité d'isoler les cellules de la MCI de blastocystes humains et de les maintenir en culture (Bongos et al, 1994). C'est en 1995 que la première lignée de cellules ES de primate (la lignée R278.5) fut établie par le groupe de James A. Thomson du Genome Center of Wisconsin, à Madison aux Etats-Unis à partir d'un blastocyste male de singe rhésus (Thomson, Kalishman et al. 1995). Dans cet article, les auteurs constataient que les ES de primates différaient significativement des ES de souris mais ressemblaient aux cellules souches de carcinomes embryonnaires humaines, ce qui permettait de penser qu'il serait possible de maintenir en culture des cellules souches embryonnaires humaines (hES). La démonstration fut faite 3 ans plus tard par le même groupe

américain et publié dans la revue Science en 1998 (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). L'origine des cellules hES est illustrée ci-dessous (**Figure 4**).

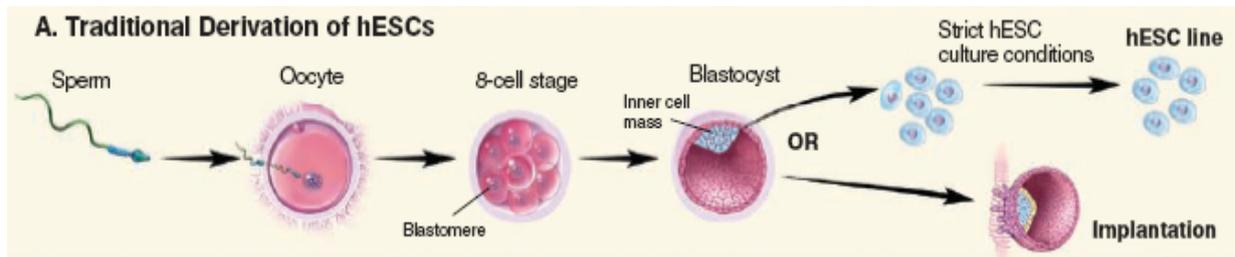


Figure 4 : Dérivation des cellules souches embryonnaires humaines à partir de la masse cellulaire interne d'un blastocyste au cours d'une fécondation in-vitro. Banque d'images du NIH. © 2008 Thérèse Winslow

Dans cet article, quatorze MCI ont été isolées à partir de blastocystes humains et cinq lignées de cellules hES, (3 males et 2 femelles) ont été dérivées et caractérisées. La méthode de dérivation pratiquée par ces premières équipes et appliquée depuis dans la majorité des laboratoires de recherche est l'isolement immunochirurgical de la MCI. Elle implique une lyse trophectodermique par réaction anticorps-complément. Dans cette technique, le blastocyste est tout d'abord traité par de la pronase, une enzyme qui permet de dissoudre la zone pellucide. Le trophectoderme est ensuite lysé par traitement avec les anticorps d'un sérum total anti-humain et du complément provenant de cochon d'Inde. Après rinçage, la MCI est isolée et mise en culture sur une couche de cellules nourricières, préalablement inactivée de manière à ce qu'elles ne prolifèrent plus. En raison de l'utilisation de complément d'origine animale, cette méthode présente un risque de contamination de la lignée par des pathogènes animaux et est associée à un rendement assez faible de l'ordre de 1/8. Deux méthodes alternatives ont alors été développées (Kim, Oh et al. 2005). Elles permettent de s'adapter à la qualité du blastocyste et présentent l'avantage de diminuer le risque de contamination par des pathogènes animaux :

- **la culture d'embryon entier** : lors de ce procédé, bien que la MCI soit présente, le risque de perte des cellules ES suite à la prolifération plus rapide des cellules trophectodermiques n'est pas négligeable. Une variante consiste à utiliser un laser pour détruire le trophectoderme après la mise en culture de l'embryon entier (Cortes, Sanchez et al. 2008).
- **la culture d'embryon partiel** : cette technique consiste à isoler mécaniquement la MCI à l'aide d'une pipette de verre ultrafine ou plus récemment par l'assistance d'un

laser. Elle permet notamment de diminuer le problème d’envahissement par les cellules trophoblastiques tout en préservant une efficacité similaire à la lyse immunochirurgicale.

Le diagnostic pré-implantatoire offre également la possibilité d’identifier à partir des blastomères, au stade morula, les embryons porteurs d’une maladie génétique et de dériver en utilisant la technique décrite précédemment des lignées de hES porteuses de mutations génétiques. Nous en reparlerons dans le chapitre 2 (au paragraphe 2.1.1.2).

2.2.2. Les cellules souches germinales (EGCs)

En novembre 1998, soit en même temps que la publication de la dérivation des premières lignées hES par l’équipe de Thomson, un autre groupe américain dirigé par John D. Gearhart à l’Université de Baltimore a réussi à dériver plusieurs lignées de cellules souches dites germinales (hEGC) à partir des cellules primordiales germinales qui sont des précurseurs des ovocytes et des spermatozoïdes prélevées sur les crêtes génitales de fœtus humains avortés entre la 5^{ème} et la 9^{ème} semaine de développement (Shamblott, Axelman et al. 1998). Ces hEGC partagent plusieurs propriétés avec les cellules hES. Elles ont notamment des capacités de différenciation étendues (**Figure 5**). Ces cellules sont considérées comme pluripotentes mais sont distinctes des cellules ES dérivées de la MCI (Kerr, Gearhart et al. 2006; Kerr, Shamblott et al. 2006).

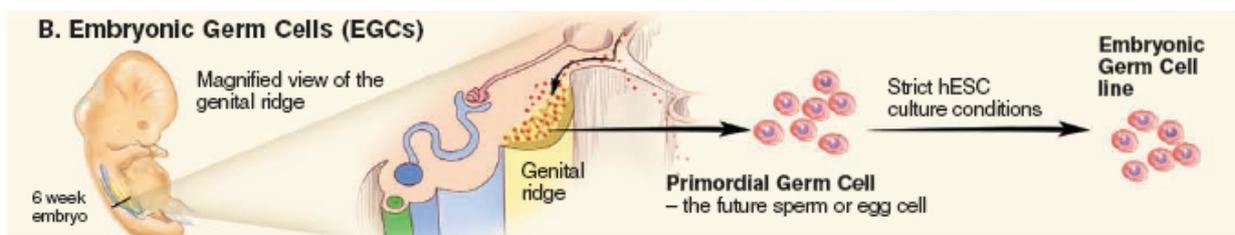


Figure 5 : Dérivation des cellules souches embryonnaires germinales à partir des crêtes génitales de blastocystes au cours d’une fécondation in-vitro. Banque d’images du NIH. © 2008 Thérèse Winslow.

2.2.3. Induction expérimentale de la pluripotence

Les cellules hES représentent le seul type « naturel » de cellules souches pluripotentes, mais il existe plusieurs méthodes d’induction expérimentale de la pluripotence regroupées sous le terme de reprogrammation.

2.2.3.1 Le transfert nucléaire somatique (SCNT)

Dans les années 50, les équipes des professeurs Briggs et King établir les bases de la technique du transfert nucléaire (autrement dit la technique du clonage) en montrant le potentiel « développemental » des noyaux de cellules issues d'embryons et de têtards en les implantant dans des oocytes énuclés (King and Briggs 1955). En 1958, la technique du transfert nucléaire somatique fut finalement expérimentée par l'équipe du Professeur John Gurdon sur le modèle *Xenope* (Gurdon, Elsdale et al. 1958). En 1996, avec la naissance du très médiatique mouton « Dolly », le Professeur Ian Wilmut démontra pour la première fois que ce procédé fonctionnait aussi chez le mammifère (Campbell, McWhir et al. 1996).

Dans cette technique, après collection des oocytes, leurs noyaux sont retirés et remplacés par celui d'une cellule somatique différenciée. Le noyau somatique avec 2N chromosomes est reprogrammé et se comporte alors comme un zygote qui s'engage dans un programme développemental en progressant vers le stade blastocyste. Il est alors possible, en suivant les techniques décrites plus haut, d'isoler à partir de la masse cellulaire interne les cellules ES (**Figure 6**).

Aujourd'hui, la technique de dérivation de cellules pluripotente utilisant cette méthode est techniquement au point chez le primate (Byrne, Pedersen et al. 2007) mais aussi chez l'Homme (French, Adams et al. 2008).

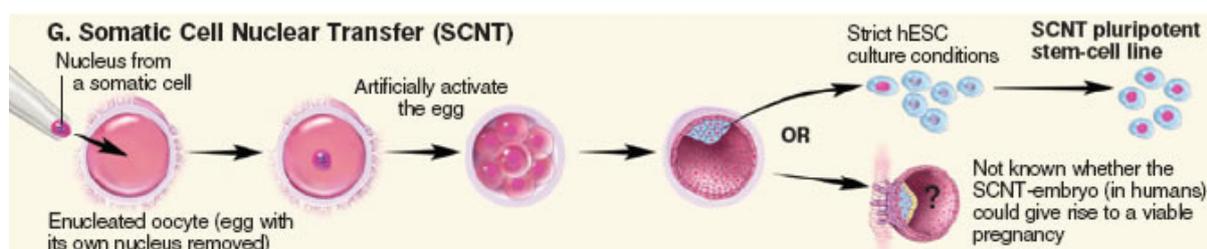


Figure 6 : Principe du transfert nucléaire somatique. Banque d'images du NIH. © 2008 Thérèse Winslow.

Rappelons toutefois que cette technique est interdite chez l'Homme. L'obtention par cette technique de blastocyste permettrait la dérivation de cellules souches pluripotentes, c'est le principe du clonage thérapeutique alors que si l'embryon était réimplanté et se développait normalement cette technique correspondrait au clonage reproductif.

Une variation de cette technique, le transfert nucléaire altéré (ANT), vise à créer des lignées de cellules pluripotente en transférant dans l'oocyte un noyau dont le gène *Cdx2*,

requis pour la formation du trophoctoderme, est délété. Il n'y a donc pas de création d'embryon au sens strict puisque l'embryon n'est pas « complet » et ne peut pas être réimplanté (Meissner and Jaenisch 2006).

2.2.3.2 La fusion cellulaire

En 2005, l'équipe de Kevin Eggan de l'université d'Harvard a décrit qu'il était possible de reprogrammer des cellules de peau humaine en les fusionnant avec des cellules ES humaines (Cowan, Atienza et al. 2005). Cette expérience montrait que des facteurs contenus dans la cellule ES non seulement maintenaient l'état d'indifférenciation, mais surtout étaient capables de l'induire à partir de cellules différenciées. Les hybrides obtenus sont tétraploïdes mais ce modèle est cependant intéressant pour étudier les mécanismes moléculaires qui dirigent la reprogrammation (Do and Scholer, 2011) (**Figure 7**).

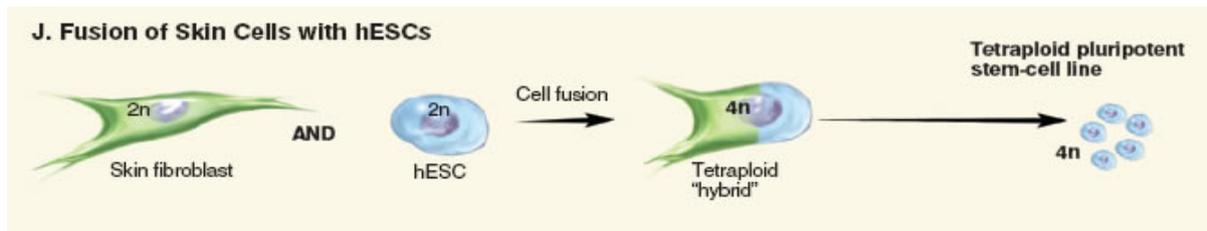


Figure 7 : Principe de la fusion cellulaire. Banque d'images du NIH. © 2008 Thérèse Winslow.

2.2.3.3 La reprogrammation directe

Dans son éditorial de « Science » du 19 décembre 2008, Bruce Alberts présentait la sélection des 10 découvertes scientifiques majeures récentes. Était classée en tête, la reprogrammation de cellules adultes spécialisées en cellules pluripotentes (iPS, *induced Pluripotent Stem cells*) ayant des potentialités très proches, sinon identiques, aux cellules ES. Pour la première fois des cellules embryonnaires étaient produites en laboratoire en l'absence d'embryons ou d'ovocytes. Tout avait commencé 2 ans plus tôt, le 25 août 2006, par une publication dans la revue « Cell » de chercheurs de l'Université de Kyoto (Takahashi and Yamanaka 2006). La reprogrammation est obtenue par l'infection de fibroblastes murins par des rétrovirus permettant la surexpression de 4 gènes : *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc* qui codent pour des facteurs de transcription choisis parmi une liste de 24 gènes connus pour jouer un rôle dans la pluripotence des cellules ES (**Figure 8**).

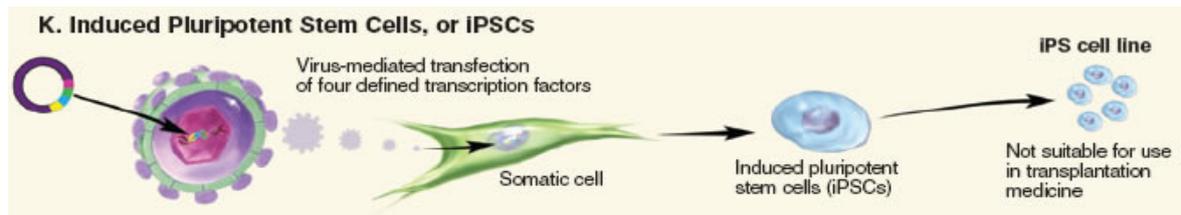


Figure 8 : Principe de l'induction de la pluripotence dans une cellule somatique par surexpression forcée de certains gènes. Banque d'images du NIH. © 2008 Thérèse Winslow.

Ce principe fut ensuite rapidement adapté à l'Homme par la même équipe en traduisant des fibroblastes de derme humain avec la même combinaison de gènes (Takahashi, Tanabe et al. 2007). Dans le même temps, l'équipe américaine de James A. Thomson a réussi également à générer des cellules iPS en utilisant une combinaison de gènes légèrement différente : *NANOG*, *OCT4*, *SOX2* et *LIN28* (Yu, Vodyanik et al. 2007). Les fibroblastes reprogrammés en cellules iPS par l'une de ces méthodes présentent un phénotype semblable aux cellules hES en termes de morphologie, prolifération et expression des marqueurs de pluripotence. Les premières études visant à comparer l'expression génique et épigénétique des cellules ES et iPS à l'échelle du génome entier avaient conclu à des profils identiques (Maherali, Sridharan et al. 2007) ; Wernig, 2007 ; Mikkelsen, 2008 ; (Amabile and Meissner 2009), mais cette notion est actuellement discutée (Stadtfield, Apostolou et al.; Chin, Mason et al. 2009).

Depuis, il a été montré qu'il était également possible d'obtenir des cellules iPS à partir de nombreux types cellulaires somatiques, en utilisant des « cocktails » de facteurs de pluripotence différents (**Tableau 1**).

Human	MS	Fibroblasts	OKSM	0.02%	Takahashi et al. 2007
			OSLN	0.02%	Yu et al. 2007
			OKS	0.002	Nakagawa et al. 2008
		Mobilized peripheral blood	OKSM	0.01%	Loh et al. 2009
			OSLN	<0.01%	Haase et al. 2009
		Cord blood endothelial cells	OKSM	ND	Eminli et al. 2009
			OS	<0.01%	Giorgetti et al. 2009
		Adipose-derived stem cells	OKSM	0.5%	Sugii et al. 2010
			OKS	<0.1%	Aoki et al. 2010
		EN	Hepatocytes	OKSM	0.1%
EC	Keratinocytes	OKSM	ND	Aasen et al. 2008	
		OKS	ND	Aasen et al. 2008	
	Neural stem cells	O	<0.004%	JB Kim et al. 2009b	
EX	Amniotic cells	OKSM	0.05%–1.5%	C Li et al. 2009	
		OSN	0.1%	Zhao et al. 2010	

Tableau 1 : Reprogrammation de cellules somatiques humaines de différentes origines en cellules iPS en utilisant différents facteurs de reprogrammation (MS) mesoderme; (EN) endoderme; (EC) ectoderme; (EX) extraembryonnaire ; (K) Klf4; (L) Lin28; (M) c-Myc; (O) Oct4; (S) Sox2. (D'après Stadtfield and Hochedlinger, 2011)

Ainsi, il est possible de reprogrammer certaines cellules avec 2 voir 1 facteur de reprogrammation. Cela semble d'autant plus faisable que la cellule à reprogrammer est dans un état peu différencié. Par exemple il est possible de reprogrammer des cellules souches

neurales avec seulement le gène OCT4 car ces cellules expriment déjà certains de ces facteurs (Kim, Zaehres et al. 2009). Bien que la technique soit très robuste, le tableau ci-dessus montre que les rendements de ces techniques sont très faible et toujours <1%. Toutefois, cela est suffisant pour obtenir plusieurs clones de cellules iPS à partir de plusieurs milliers de cellules somatiques.

Les perspectives ouvertes par l'utilisation de ces cellules notamment pour la thérapie cellulaire font avancer très rapidement la recherche sur ce sujet et de nouvelles stratégies pour induire la pluripotence, de manière plus efficace et plus sûre, sont actuellement testées (Patel and Yang; O'Malley, Woltjen et al. 2009).

Très schématiquement, plusieurs méthodes non intégratives se sont développées afin de générer de nouvelles générations de cellules iPS (Sidhu; Zhou and Ding) incluant :

- **des constructions lentivirales** : ces constructions intègrent des systèmes d'excision permettant d'enlever les facteurs de reprogrammation qui se seraient intégrés dans la séquence d'ADN de la cellule reprogrammée en utilisant soit le système cre-LoxP basé sur la recombinaison (Stadtfield, Nagaya et al. 2008; Yu, Hu et al. 2009), soit le système PiggyBac basé sur la transposition (Kaji, Norrby et al. 2009; Yusa, Rad et al. 2009). Ces constructions sont des avancées technologiques mais il existe encore des problèmes de sécurité du au site LoxP résiduel (Soldner, Hockemeyer et al. 2009).
- **des constructions utilisant des virus non intégratifs** : Alors que les vecteurs rétroviraux requiert une intégration dans les chromosomes hôtes pour exprimer les gènes de reprogrammation, les vecteurs basés sur l'ADN comme les Adenovirus ou les virus AAV restent sous forme episomale et ne requiert pas d'intégration toutefois ils peuvent occasionnellement s'intégrer avec une fréquence qui dépend des virus d'intégré. Un virus particulièrement intéressant utilisable comme vecteur d'expression pour la reprogrammation est le virus Sendaï car il reste cytoplasmique (Seki, Yuasa et al.; Fusaki, Ban et al. 2009).
- **des méthodes d'inductions transitoires non virales** : la transfection plasmidique est suffisante à la reprogrammation bien que son efficacité soit très faible (Okita, 2008)
- **protéines recombinantes** : cette dernière méthode semble prometteuse puisque des lignées d'iPS murines et humaines ont été produite grâce à des protéines recombinantes codées par les gènes permettant la reprogrammation et taguées avec un peptide poly-arginine permettant leur passage transmembranaire (Kim, Kim et al.

2009; Zhou, Wu et al. 2009). Toutefois, ces méthodes ont une efficacité très faible de l'ordre de 10 fois inférieure à celle obtenue avec les lentivirus.

- **les micro-ARNs** : ce sont des acteurs majeurs de la régulation des propriétés de pluripotence. Nous en reparlerons dans le paragraphe 2.4.3. Ces petits ARN dont le mir-302 est capable de reprogrammer des cellules souches du follicule pileux du cheveu en cellules iPS (Lin, Chang et al.). D'autres part, il a été montré que ce micro-RNA régulait l'un des gènes de pluripotence LIN28 (Zhong, Li et al., 2011).
- **les ARN modifiés** : Au lieu d'utiliser les gènes, des chercheurs de Boston aux Etats-Unis ont réussi à reprogrammer des iPS avec des ARN modifiés codant pour les facteurs de pluripotence avec une efficacité comparable aux autres méthodes (Warren, Manos et al., 2011).
- **petites molécules** : certaines petites molécules chimiques, les modulateurs épigénétiques directes et les molécules de signalisation intracellulaire favorisent le processus de reprogrammation permettant dans certains cas de s'affranchir de l'utilisation de certains facteurs de pluripotence tel que les oncogènes *KLF4* et/ou *cMYC*. Le **tableau 2** suivant présente les principales molécules favorisant la pluripotence :

Molécules	Fonctions	Protocole	Espèce et type cellulaire	Commentaires	Références
BIX-01294	inhibiteur de l'histone méthyltransférase G9a	OK OK SKM	fibroblastes de souris Progéniteurs neuraux de souris	OK + BIX-01294 augmente l'efficacité de 5 fois plus que OK et est capable de remplacer S. OK + BIX-01294 augmente l'efficacité de 1.5 fois plus que OSKM et approximativement 8 fois plus que OK, et BIX-01294 est capable de remplacer S Capable de remplacer O dans les progéniteurs neuraux mais avec une efficacité extrêmement faible.	Shi et al 2008
BayK8644	agoniste des canaux calcium type-L	OK	fibroblastes de souris	OK + BIX-01294 + BayK8644 augmente l'efficacité de 15 fois plus que OK	
RG108		OK		OK + BIX-01294 + RG108 augmente l'efficacité de reprogrammation de 30 fois plus que OK	
AZA (5 azacytidine)	inhibiteur des DNA méthyltransférases (DNMTs)	OSKM OSKM OSK		augmente l'efficacité de reprogrammation 4-fois plus que OSKM et permet la reprogrammation complète augmente l'efficacité de reprogrammation 10 fois avec OSKM augmente l'efficacité de reprogrammation - 3-fold increase in efficiency with OSK	Mikkelsen et al 2008
dexaméthasone	glucocorticoïde stéroïdien	OSKM	fibroblastes de souris	augmente l'effet de la 5' azacytidine de 2.6-fois augmente l'efficacité de plus de 100 fois avec OSKM augmente l'efficacité de plus de 100 fois avec OSK	Huangfu et al 2008
VPA (Acide valproïque)	inhibiteur des histones déacétylases (HDACs)	OSKM		augmente l'efficacité de plus de 10-20 fois avec OSK	
		OSK	fibroblastes humains	augmente l'efficacité de plus de 10-20 fois avec OSK	
		OS		VPA est capable de remplacer K et M	
TSA (Trichostatine A)		OSKM	fibroblastes de souris	augmente l'efficacité de plus de 15 fois avec OSKM	
SAHA (Acide hydroxamique suberoylanilide)		OSKM		augmente l'efficacité de plus de 2 fois avec OSKM	
PI30325901 + CHIR99021 (2i)	inhibiteur de MEK et de GSK3 respectivement	OK	cellules souches neurales de souris	associé au LIF permet l'acquisition du stade pluripotent dans des cellules pré-iPS reprogrammées par OK.	Silva et al 2008
			progéniteurs neuraux de souris	PD0325901 active la prolifération des iPS et inhibe celles qui ne sont pas reprogrammées	Shi et al 2008
A-83-01	inhibiteur du TGF-β	OSK	progéniteurs de foie de rat	associé au LIF et 2i pour maintenir les iPS de rat	Li et al 2009
			fibroblastes humains	associé au LIF et 2i pour maintenir les hiPS	

Tableau 2 : principales petites molécules favorisant la reprogrammation.

(Modifié D'après Li and Ding, 2011)

Parmi ces molécules, l'acide valproïque, un modulateur bien connu de l'état de condensation de la chromatine permet de reprogrammer un fibroblaste humain avec uniquement OCT4 et SOX2 (Huangfu, Osafune et al. 2008). D'autres petites molécules ciblant les voies de signalisation telles que des inhibiteurs de la voie de la GSK3 (Silva, Barrandon et al. 2008), sont à l'essai. Dans un futur proche, des criblages de petites molécules à grande échelle devraient permettre de disposer de nouvelles molécules efficaces pour induire la pluripotence (Gonzalez, Jennings et al., 2011). Très récemment, une nouvelle revue fait le point sur l'ensemble des molécules qui ont été utilisées depuis 2008 pour favoriser la reprogrammation complète en cellules iPS (Ao, Hao et al., 2011; Yuan, Li et al., 2011).

En résumé, il existe de nombreuses méthodes en cours de développement permettant la reprogrammation mais les rendements sont faibles. Pour contourner en partie ce problème de rendement, plusieurs équipes ont montré que la reprogrammation de cellules souches somatiques non fibroblastiques à partir de cellules non entièrement différenciées telles que des kératinocytes, permettaient d'augmenter l'efficacité de la reprogrammation (Aasen, Raya et al. 2008). Après avoir donné un panorama des différentes sources de cellules pluripotentes, il convient de présenter les processus biologiques à la base de la pluripotence.

2.3 Bases moléculaires de l'identité des cellules pluripotentes humaines

Ces dernières années, des progrès importants ont été accomplis dans la compréhension des bases moléculaires de l'identité des cellules pluripotentes. Ces mécanismes tendent à maintenir ces cellules dans un état d'équilibre en s'opposant :

- **à la sénescence naturelle** : ce processus leur permet de se renouveler à l'identique, théoriquement de manière illimitée (Zeng and Rao 2007). C'est cette propriété d'auto-renouvellement qui permet de générer une ou deux cellules souches filles en fonction de la nature symétrique ou asymétrique des divisions.
- **à la propension de ces cellules à se différencier** : ce mécanisme est appelé maintien de l'état d'indifférenciation ou maintien de la pluripotence.

Ces deux mécanismes sont très étroitement interconnectés et participent de manière indissociable au maintien de l'identité des cellules ES.

On distingue schématiquement trois niveaux d'intégration de ces mécanismes :

- **la régulation génique** : elle est médiée par l'expression de gènes spécifiques.
- **la régulation épigénétique** : elle concerne un niveau d'intégration supérieur au cours duquel plusieurs dizaines voir centaines de gènes peuvent être réprimés ou au contraire pré-activés ensemble par contrôle de l'architecture chromatinienne de la molécule d'ADN.
- **la régulation par des facteurs extrinsèques** : elle est médiée par des voies de signalisation intracellulaire qui permettent à la cellule de répondre et de s'adapter à un moment donné à des signaux morphogéniques paracrines de leurs microenvironnements influant leur comportement et leur identité.

2.3.1. Réseaux de régulation génique

Trois gènes codant des facteurs de transcription sont au cœur de la régulation de l'identité des cellules ES. Il s'agit de *NANOG*, *SOX2* et *OCT4/POU5F1* qui sont des gènes également fortement exprimés dans la MCI des blastulas murines et humaines. Les premières études indiquaient que les embryons déficients pour le facteur *OCT4* mourraient au stade blastocyste et que les cellules ES présentant un niveau d'expression d'*OCT4* perturbé perdaient leur propriété d'auto-renouvellement en induisant leur différenciation (Nichols, Zevnik et al. 1998; Niwa, Miyazaki et al. 2000). Concernant le facteur de transcription à homéodomaine *NANOG*, il fut montré que celui-ci soutenait l'auto-renouvellement des cellules ES de souris en l'absence de LIF, une cytokine essentielle pour leur maintien à l'état indifférencié. (Chambers, Colby et al. 2003; Mitsui, Tokuzawa et al. 2003). Enfin, le facteur de transcription *SOX2* a été identifié par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine dans les cellules ES et le produit de ce gène forme avec OCT4 un complexe protéique.

L'identification des acteurs impliqués dans les processus moléculaires qui dirigent l'identité des cellules ES a également fortement bénéficié de la mise au point de technologies exploratoires exhaustives de l'expression des gènes par une approche utilisant le transcriptome (Calhoun, Rao et al. 2004). Ces études ont montré d'une part des différences de profils d'expression entre les différents types de cellules pluripotentes, par exemple entre les cellules de carcinomes embryonnaires et les cellules ES (Liu, Shin et al. 2006), mais aussi entre espèces entre les cellules ES humaines et murines (Sato, Sanjuan et al. 2003). En revanche, les profils d'expression de différentes lignées ES d'une même espèce restent très proches sans être identiques (Li, Liu et al. 2006).

Par la suite, plusieurs études, dont celle menée par le groupe américain de l'Institut de Technologie de Cambridge dirigé par Rudolf Jaenisch, ont posé les bases du mécanisme de pluripotence en découvrant que les protéines codées par ces trois gènes clés étaient capables de se fixer mutuellement dans leurs propres séquences promotrices établissant ainsi une boucle d'auto-régulation (Boyer, Lee et al. 2005). Par exemple, les protéines OCT4 et SOX2 reconnaissent le promoteurs du gène *NANOG* (Rodda, Chew et al. 2005) (**Figure 9**).

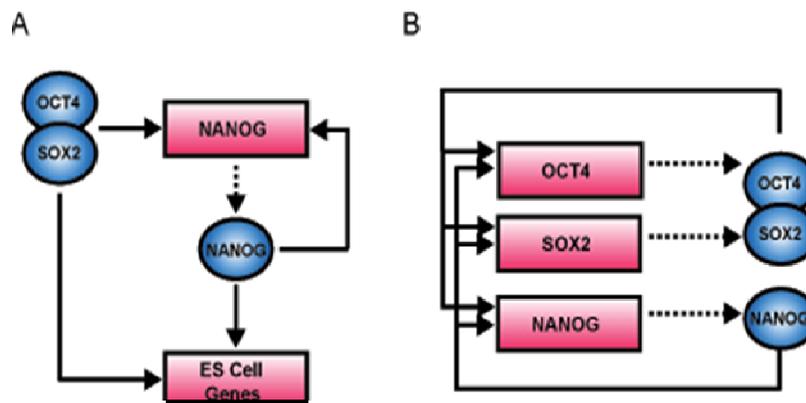


Figure 9 : Motifs de régulation transcriptionnelle dans les cellules souches embryonnaires humaines.

(A) Exemple de relations auto-régulatrices entre les 3 facteurs « clés » de pluripotence. Les régulateurs sont représentés par des cercles bleus ; les promoteurs des gènes par des rectangles roses. La liaison d'un régulateur à un promoteur est indiquée par une flèche pleine, les gènes codant pour les régulateurs sont liés à leur régulateur respectif par des flèches pointillées. (B) Boucle auto-régulatrice interconnectée formée par *Oct4*, *Sox2* et *Nanog*. (D'après Boyer, 2005)

Ces études démontrèrent également que ces protéines co-occupaient les promoteurs de plus de 300 gènes dont certains étaient déjà identifiés comme jouant un rôle fondamental soit dans l'identité cellulaire, soit dans la différenciation spécifique de lignage.

De plus, ce réseau génique semble être régulé de manière précise par des modulations de la balance d'expression de ces 3 gènes pouvant induire un signal de différenciation vers l'un des lignages spécifiques. En effet, le maintien de l'expression de *SOX2* est nécessaire à l'induction et au maintien de l'identité neurale (Graham, Khudyakov et al. 2003) alors que les variations du niveau d'expression d'*OCT4* semble réguler la différenciation précoce (Rodriguez, Velkey et al. 2007) notamment celle du mésoderme cardiaque en agissant comme un compétiteur avec d'autres facteurs comme *SOX17* (Stefanovic, Abboud et al. 2009).

Les travaux de recherche actuels s'orientent vers une meilleure compréhension des relations géniques existant entre ces 3 gènes clés de pluripotence et ceux identifiés comme fortement exprimés dans les cellules hES ou intervenant dans la différenciation précoce.

Afin de mieux caractériser ces listes de gènes, plusieurs méta-analyses concernant des résultats de transcriptome ont été récemment publiées. Parmi elles, le travail réalisé par le groupe de John De Vos à Montpellier a regroupé les données provenant de 38 études transcriptomiques dans un outil informatique Amazonia! disponible sur internet à l'adresse suivante : <http://amazonia.transcriptome.eu>. Cette étude montre qu'un peu plus de 1000 gènes sont retrouvés modulés en commun dans au moins 3 études et 48 gènes dans au moins 10 études établissant ainsi une liste consensus de gènes exprimés dans les cellules hES (Assou, Le Carrouer et al. 2007). D'autres études ont également cherché à établir de nouvelles listes consensus de gènes de pluripotence dont celle du groupe de travail de la société savante américaine des cellules souches (ISSCR) qui a réalisé les profils d'expression génique de 59 lignées de hES dérivées à travers le monde (Adewumi, Aflatoonian et al. 2007).

2.3.2 Régulation épigénétiques

Les modifications épigénétiques sont définies par des changements stables dans l'expression des gènes. Ce processus est très important pour le maintien de l'état de pluripotence car il permet de réprimer des gènes cibles spécifiques de lignage. Il existe principalement deux types de régulation: la méthylation répressive des promoteurs (ilots CpG) et des modifications post-traductionnelles des histones, qui sont des protéines structurales de la chromatine constituant le nucléosome et régulant le degré de compaction de la chromatine.

De manière générale, la chromatine relâchée, l'euchromatine, est permissive à la transcription c'est-à-dire qu'elle se présente dans une configuration stérique favorable à l'accès du complexe d'initiation transcriptionnelle. A l'inverse, la chromatine se condense au cours du processus de différenciation cellulaire pour former l'hétérochromatine conduisant à la répression des gènes non requis dans un lignage spécifique donné (**Figure 10**).

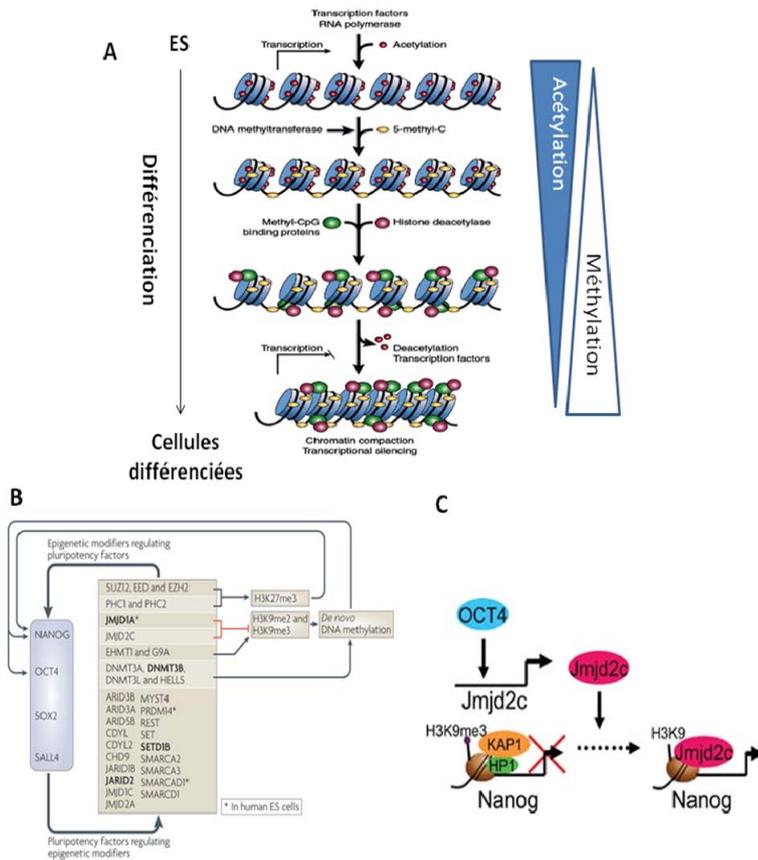


Figure 10 : Régulation de la pluripotence par des facteurs épigénétiques :

(A) Les cellules hES sont caractérisées par un état de condensation de la chromatine globalement relâchée. Les histones qui contrôlent l'architecture de la chromatine sont dans un état d'hyperacétylation et les promoteurs sont hypométhylés. Au cours de la différenciation des déacétylases (HDACs) interviennent et il y a méthylation des promoteurs médiés par des méthyltransférases. Ces événements contribuent à éteindre l'expression de gènes non requis au cours d'une différenciation spécifique de lignage (Modifié d'après www.med.ulf.edu). (B) Les gènes de pluripotence sont impliqués dans une boucle d'auto-régulation avec les facteurs épigénétiques (D'après Hemberger, 2009). (C) Oct4 se fixe sur le promoteur du gène *Jmjd2c* codant une déméthylase qui se fixe à son tour sur le promoteur et prévient la méthylation de la lysine K9 de l'histone 3 au niveau du promoteur du gène *Nanog*. Ceci empêche la reconnaissance de complexes répresseurs tels que KAP1 ou HP1.

Ces événements participent très clairement au contrôle en aval de certains gènes cibles de pluripotence ainsi qu'au processus de différenciation précoce. Parmi les modifications touchant les histones, l'acétylation de certaines lysines des histones H3 et H4 entraîne une neutralisation des charges positives qui contribuent à diminuer l'interaction entre deux nucléosomes adjacents. Ces modifications entraînent un dépliement de l'ADN favorisant l'activation de la transcription. Le processus est régulé à la fois par des acétylases et des déacétylases. Par ailleurs, la méthylation intervient également sur différentes lysines de l'histone H3 avec soit un effet activateur sur la transcription comme c'est le cas de la diméthylation de la lysine 4 (H3K4me2) qui est médiée par les protéines homologues du groupe trithorax (Ruthenburg, Allis et al. 2007; Shilatifard 2008), soit un effet répresseur comme les bi-méthylations de la lysine 9 (H3K9me2) et les tri-méthylations de la lysine 27

(H3K27me3) qui favorisent la compaction de la chromatine. La méthylation de la lysine 27 est assurée par des complexes protéiques homologues du groupe polycomb (**Figure 11**).

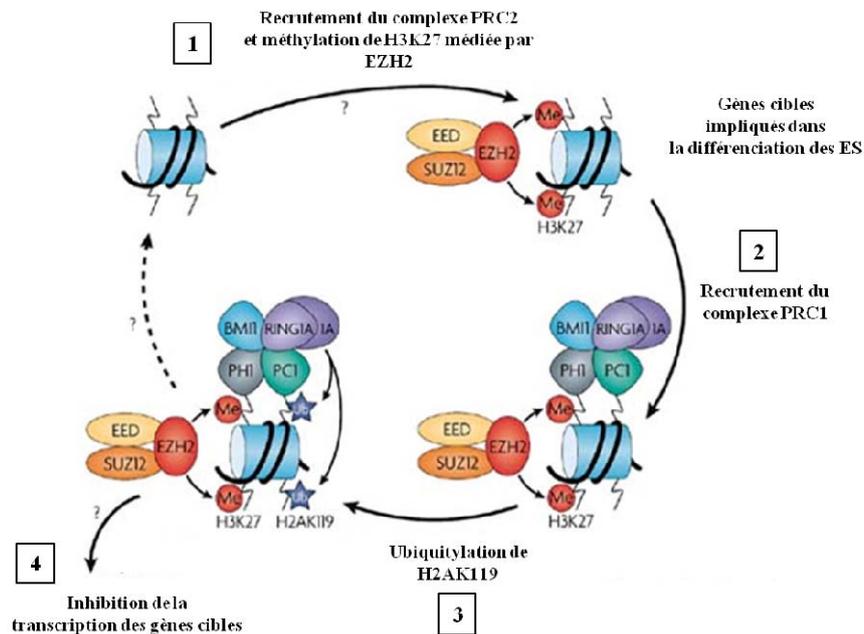


Figure 11 : Régulation de la transcription par les complexes Polycomb. (D'après Spivakov, 2007)

Ils agissent en réprimant plusieurs centaines de gènes dont certains sont des gènes clés du développement. Ces complexes sont donc directement impliqués dans le maintien de l'état indifférencié des cellules ES aussi bien chez la souris (Boyer, Plath et al. 2006) que chez l'Homme (Ren 2006).

Le mécanisme n'est pas parfaitement compris mais on sait que le complexe polycomb PRC2 est recruté au niveau des régions CpG méthylés dans les promoteurs des gènes cibles et que la spécificité de cette reconnaissance fait vraisemblablement intervenir les protéines SOX2, OCT4 et NANOG (Squazzo, O'Geen et al. 2006; Endoh, Endo et al. 2008). Une fois fixée sur sa cible, le complexe PRC2 qui contient la protéine EZH2 méthyle la lysine 27 sur l'histone H3. Dans un second temps, le complexe polycomb PRC1 est à son tour recruté. Il contient notamment la protéine BMI1 qui est également impliquée dans l'autorenouvellement des cellules souches adulte ainsi que les protéines RING1 et RING2 responsable de l'ubiquitylation de la lysine 119 de l'histone H2A. Ces deux complexes protéiques sont responsables de la répression transcriptionnelle mais on ignore encore quel est le mécanisme mis en jeu (Ku, Koche et al. 2008; Simon and Kingston 2009).

La régulation épigénétique des cellules ES par méthylation ou acétylation des histones présentent également une autre particularité. En effet, il a été récemment montré l'existence de modifications non conventionnelles des histones qui sont appelées modifications bivalentes (**Figure 12**).

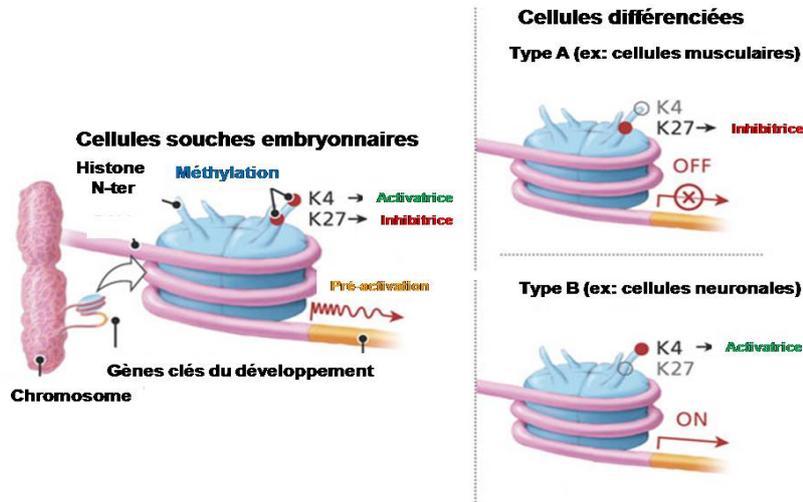


Figure 12 : Modifications bivalentes des lysines de l'histone H3 dans les cellules ES. Le profil bivalent (activation et inhibition) évolue lors de la différenciation vers un état univalent (Activateur ou inhibiteur) selon le type cellulaire.

Elles sont caractérisées par l'association en même temps de marques activatrices (H3K9ac et H3K4me) et répressives (H3K27me) dans plusieurs gènes spécifiques de lignage (Bernstein, Mikkelsen et al. 2006). Ce procédé permet un état de « pré-activation » de ces gènes qui peuvent ainsi être rapidement induits dans un programme de différenciation. Celui-ci s'accompagne d'une transition d'un profil bivalent vers un profil univalent soit activateur soit répresseur en fonction des gènes et du type de cellules différenciées. Ce mécanisme de régulation épigénétique n'a été décrit que dans les cellules ES et semble ainsi spécifique de ce type de cellules.

2.3.3. Régulations par les microARNs

Les microARNs apparaissent comme un nouveau groupe de régulateurs intervenant dans les cellules de mammifères pour réprimer l'expression génique au niveau post-traductionnel (Siomi and Siomi; Farh, Grimson et al. 2005; Krek, Grun et al. 2005; Lewis, Burge et al. 2005; Lim, Lau et al. 2005) (**Figure 13**).

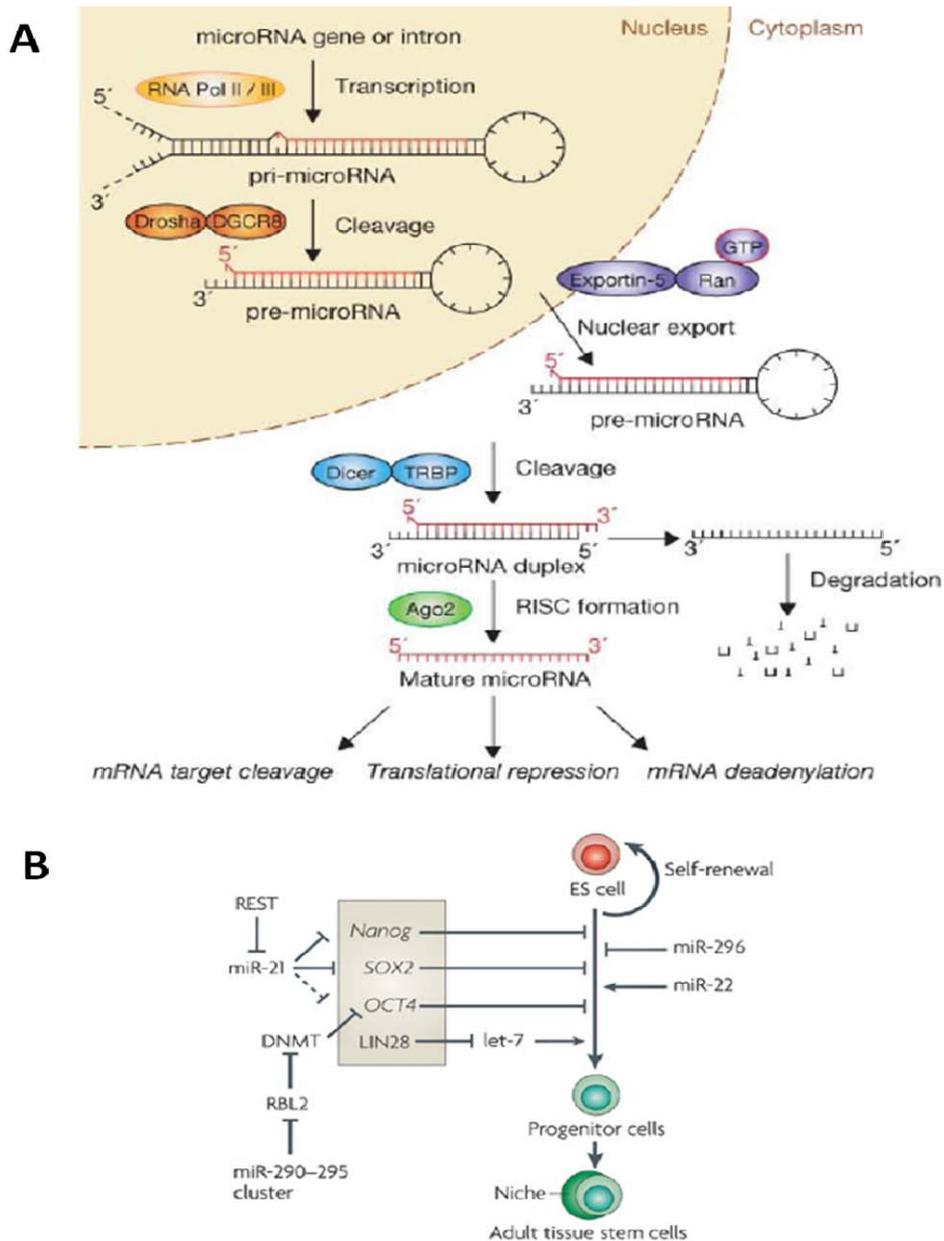


Figure 13 : Régulation de la pluripotence par les miRNA. Biogénèse et mécanisme d'action des microARNs. (D'après Winter J et al 2009). (B) Régulation des gènes de pluripotence par des miRNAs (D'après Gangaraju, 2005).

Les microARNs sont produits à la suite d'une série d'étapes biochimiques. Tout d'abord, l'expression de certains gènes conduits à un transcrit primaire appelé pri-microARN. Puis, dans le compartiment nucléaire, ces transcrits primaires sont reconnus au niveau d'une structure de type « tige-boucle » par un complexe ribonucléique de clivage appelé Drosha. Le produit de ce clivage libère cette structure de ces séquences flanquantes pour former le pré-microARN. Ce dernier est exporté vers le cytoplasme par l'intermédiaire de la voie de l'exportine 5. Par la suite, ces précurseurs sont clivés par le complexe DICER afin de générer des duplex contenant généralement 22 nucléotides. Chacun des brins de ce duplex (le

microARN mature) est ensuite incorporé dans un complexe appelé argonaute (Ago2) afin de former un complexe répresseur (RISC) lui conférant sa spécificité de reconnaissance pour des séquences d'ARN cibles. Lorsque le degré de complémentarité entre le microARN et sa cible est parfait, le complexe RISC aura pour fonction de dégrader l'ARNm. En revanche, lorsque la complémentarité n'est que partielle, ce complexe entraîne une déstabilisation de l'ARN, soit en agissant au niveau de la coiffe de l'ARNm en 5', soit par déadénylation de la queue polyA en 3' (Eulalio, Huntzinger et al. 2009). Enfin, le complexe peut également inhiber la traduction en réprimant directement le ribosome (Eulalio, Huntzinger et al. 2008; Eulalio, Huntzinger et al. 2009). Les étapes de la biogénèse de ces microARNs sont encore peu connues mais semble fortement régulées. Leurs modulations impliqueraient des hélicases, la voie du TGFβ/BMP, la voie médiée par la protéine p53 et la voie des récepteurs aux œstrogènes (Newman and Hammond, 2010).

Les microARNs participent à la régulation de nombreux processus cellulaires normaux ou pathologiques incluant la prolifération, la différenciation, la mort cellulaire et la formation de tumeur (Bushati and Cohen 2007; Schickel, Boyerinas et al. 2008). Leur implication dans le développement est maintenant acquis par différentes preuves : les souris déficientes pour DICER, une enzyme clé du processus médiée par les micro-ARNs ne se développent pas (Bernstein, Kim et al. 2003) et les lignées de ES correspondantes présentent des anomalies de prolifération et de différenciation (Kanellopoulou, Muljo et al. 2005; Murchison, Partridge et al. 2005). Certains microARNs (mir-290-295 et mir-302/367) ont été identifiés comme préférentiellement exprimés dans les cellules ES de souris (Houbaviy, Murray et al. 2003) et humaines (Suh, Lee et al. 2004; Houbaviy, Dennis et al. 2005) suggérant leur implication dans le contrôle de leur identité. En 2008, le groupe de Rudolf Jaenisch a publié dans le journal *Cell* une mise à jour du circuit de régulation génique des cellules ES de souris en intégrant les microARNs (Marson, Levine et al. 2008).

Les 3 protéines clés de la pluripotence, OCT4, NANOG et SOX2 ainsi que TCF3 sont retrouvées dans les promoteurs de microARNs spécifiques des cellules ES ainsi que dans des promoteurs de microARNs contrôlant la prolifération (miR92 et let7g) ou la différenciation spécifique de lignage (par exemple mir-9 ou mir-124a pour le lignage neural) (Krichevsky, Sonntag et al. 2006).

Au cours de mon travail de recherche, j'ai eu l'occasion au cours d'une étude réalisée avec le Docteur Xavier Nissan de constater l'importance des miRNAs dans le contrôle de la différenciation à partir des cellules hES (Nissan, Denis et al., 2011). En comparant, le profil

miRNA des progéniteurs kératinocytaires et neuraux dérivés de cellules hES (ces deux types de progéniteurs dérivant de progéniteurs plus précoces dit pan-ectodermiques), nous avons mis en évidence 4 miRNA spécifiques des progéniteurs kératinocytaires dont le miR203 qui intervient de manière fonctionnelle en favorisant à la fois l'induction de la différenciation des hES vers les kératinocytes mais aussi la reconstruction épidermique.

2.3.4 Intervention des facteurs extrinsèques

Les voies de signalisation cellulaire couplent les informations physico-chimiques à l'extérieur de la cellule avec les réseaux géniques et épigénétiques contrôlant l'état d'indifférenciation. Avant la dérivation des cellules hES, on considérait le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) comme le facteur universel de pluripotence. Bien qu'il permette le maintien à l'état d'indifférencié des cellules ES de souris, aucun effet sur les hES n'a pu être mis en évidence (Okita and Yamanaka 2006). Cette constatation implique que les informations contenues dans la très abondante littérature sur le sujet doivent nécessairement tenir compte de la source murine ou humaine des cellules ES. Toutefois, cela n'exclue pas l'existence de voies de signalisations communes mais il est nécessaire de savoir systématiquement si les connaissances de l'un des systèmes sont transposables à l'autre (Rao 2004).

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans les mécanismes qui régulent le maintien de l'identité des cellules hES que nous allons brièvement décrire (**Figure 14**).

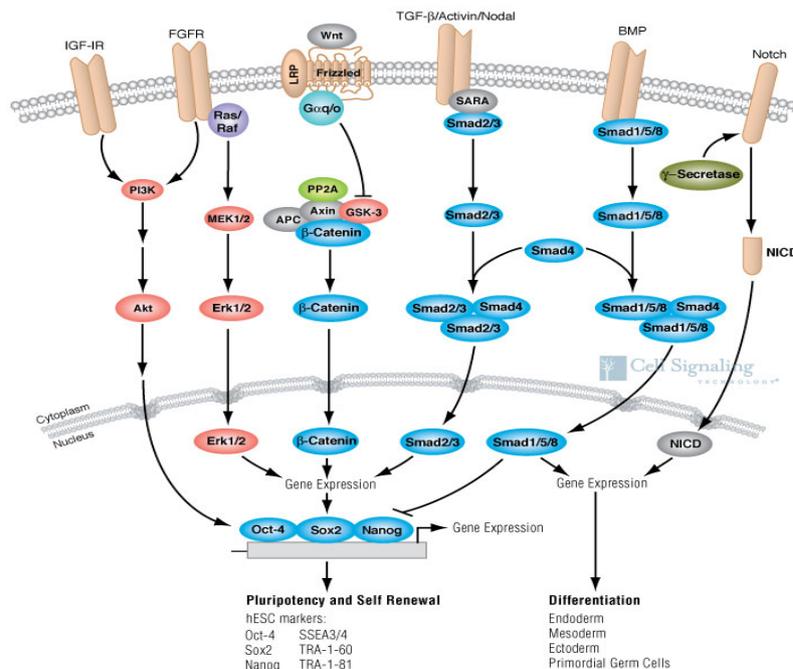


Figure 14 : principales voies de signalisations intracellulaires impliquées dans le maintien de la pluripotence. Source : www.cellsignal.com

- **la voie des récepteurs du TGFβ :**

Il s'agit de l'une des voies centrales régulant le maintien de l'état d'indifférenciation et d'auto-renouvellement des cellules hES (Valdimarsdottir and Mummery 2005). Trois familles de facteurs de croissance polypeptidiques dimériques -les Activines, les protéines morphogéniques osseuses (les BMPs) et le facteur de croissance du TGF-β- activent des récepteurs de type serine/threonine kinase. Leur stimulation entraînent la phosphorylation de facteurs de transcription mobiles, les smads, qui forment avec co-smad (smad4) un dimère pouvant se transloquer dans le noyau et s'associer à d'autres protéines afin d'activer ou d'inhiber certains gènes cibles. On distingue deux voies de signalisation. Celle qui agit par l'intermédiaire de la phosphorylation de Smad2/3 et qui dépend de l'activation de la voie par certains ligands comme TGFβ, l'Activine A ou Nodal et celle qui agit par l'intermédiaire de la phosphorylation de Smad1/5/8 qui dépend des BMPs.

- **la voie régulée par l'Activine A :**

La présence d'Activine A dans la culture des cellules hES suffit à les maintenir à l'état indifférencié soulignant l'importance de cette voie (Vallier, Alexander et al. 2005). Ce rôle central peut être expliqué par le fait que cette protéine influe sur l'expression de tous les facteurs d'auto-renouvellement comme les gènes *OCT4* et *NANOG* ainsi que sur l'activation d'autres voies de signalisation comme Wnt, FGF et Nodal (Xiao, Yuan et al. 2006). Cependant, il a aussi été montré que l'Activine A induisait la différenciation notamment vers l'endoderme mais cela ne semble se produire que si une autre voie, la voie PI3K (Phosphatidyl-inositol 3kinase), est inhibée (McLean, D'Amour et al. 2007). Plus récemment, des connections entre la voie de l'activine A et des microARNs ont été identifiées dans les cellules hES (Tsai, Singh et al., 2011).

- **la voie régulée par Nodal :**

La voie activée par Nodal semble également intervenir dans le maintien des cellules hES à l'état indifférencié. En effet, l'inhibition de cette voie par son inhibiteur physiologique Lefty, ou par de petites molécules comme le SB431542, entraîne une différenciation vers le lignage neurectodermique (Smith, Vallier et al. 2008; Chambers, Fasano et al. 2009; Patani, Compston et al. 2009).

- **la voie régulée par les BMPs :**

Plusieurs ligands appartenant à la famille des BMPs sont sécrétés par les cellules ES elles-mêmes et semblent être impliqués dans leur différenciation précoce ainsi que dans la sélection du choix des lignages. Par exemple, le BMP2 est un puissant inducteur cardiogénique (Leschik, Stefanovic et al. 2008) et le BMP4, un inducteur des cellules de l'ectoderme (Guenou, Nissan et al. 2009). L'inhibition de ces voies peut donc contribuer au maintien de l'état d'indifférenciation. Paradoxalement, la voie des BMPs est impliquée dans l'auto-renouvellement des cellules ES de souris en agissant simultanément avec la voie Jak/Stat dépendante du LIF et d'autres voies de signalisation telles que Wnt et PI3K (Lee, Lim et al. 2009).

En résumé, l'ensemble de ces études montre que les voies du TGF- β , de l'Activine et de Nodal participent à l'identité des cellules ES en favorisant l'auto-renouvellement alors que la voie des BMPs induit la différenciation spontanée des hES. Ces deux systèmes contribuent à la régulation de nombreux gènes clés de la pluripotence comme *NANOG* par exemple. Une étude très récente réalisée par l'équipe anglaise de Peter Andrews à l'université de Sheffield en Angleterre précise ce mécanisme en montrant que l'extinction de co-smad (smad4) qui est commun aux différentes voies décrites plus haut, n'empêchait pas le maintien de l'auto-renouvellement mais rendait les cellules insensibles au traitement par le BMP. De plus, l'inhibition continue de smad4 rend les cellules instables et plus permissives à l'induction neurale. Cette étude semble donc indiquer que les voies de signalisation médiées par les smads soutient la pluripotence en empêchant la différenciation dépendante du BMP plutôt que leur implication directe dans la régulation de la pluripotence (Avery, Zafarana et al., 2011).

- **la voie régulée par le FGF2 :**

Le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF ou FGF2) est utilisé quotidiennement au laboratoire pour soutenir l'auto-renouvellement des cellules hES (Xu, Inokuma et al. 2001; Wang, Zhang et al. 2005; Xu, Rosler et al. 2005; Ding, Choo et al. 2006). Il agirait en aval de l'Activine A en stimulant la voie MEK-ERK et se comporterait comme un facteur de compétence pour Nodal (Greber, 2007; Vallier, 2005 ; (Li, Wang et al. 2007). Par ailleurs, il est surprenant de constater que l'utilisation de FGF2 sur une culture de cellules ES de souris conduit au résultat inverse en induisant leur différenciation par inactivation du facteur de transcription Stat3 qui contrôle l'autorenouvellement de ces cellules par l'intermédiaire de la voie du LIF.

- **la voie canonique des Wnt :**

La voie canonique Wnt (du nom du gène de la drosophile *wingless*) est une voie de signalisation cellulaire qui régule la clairance d'une protéine cytoplasmique : la β -caténine. La voie intervient dans la cellule par l'intermédiaire de ligands qui reconnaissent la famille des récepteurs Frizzled. Leur activation entraîne une cascade conduisant à l'inhibition de la phosphorylation de la β -caténine dépendante de la GSK3 (glycogène synthase kinase) ce qui empêche sa dégradation. La β -caténine commence alors à s'accumuler et entre dans le noyau où elle joue un rôle de régulation génique activateur ou répresseur en fonction de ses partenaires. L'inhibition pharmacologique de la GSK3 par des molécules synthétiques comme la 6 bromo-indirubine 3'oxime (BIO) active la voie Wnt en augmentant la quantité de β -caténine nucléaire permettant le maintien de l'expression du gène *OCT4* (Sato, Meijer et al. 2004).

Dans le cadre de mon travail de recherche, j'ai eu l'occasion de travailler sur les voies de signalisation qui concourent à l'acquisition du phénotype neural et mésenchymateux (Denis, Rochon-Beaucourt et al., 2011). Pour cela, j'ai pu comparer par transcriptome différentiel l'expression de l'ensemble des gènes dans ces deux types de progéniteurs par rapport à la même référence, c'est-à-dire les cellules hES dont elles sont issues. En utilisant, par la suite des méthodes de bioinformatiques, il m'a été possible de construire un interactome entre les gènes régulés sur les bases des relations connus entre ces facteurs et d'identifier parmi ces gènes ceux qui sont impliqués de manière différentielle dans certaines voies de signalisation cellulaire, telle que la voie du TGF β , la voie Wnt, ou Notch.

2.4 Manipulation *in vitro* des cellules hES

2.4.1 Morphologie

Sur les bases des connaissances que nous avons résumées dans le chapitre précédent, il est possible de maintenir en culture au laboratoire les cellules hES à l'état indifférencié. Ces dernières sont rondes et de petites tailles (2-3 μ m) et présentent un rapport nucléocytoplasmique élevé. Elles prolifèrent sous la forme de colonies circulaires compactes d'aspect caractéristique et sont généralement cultivées avec des cellules nourricières (**Figure 15**).

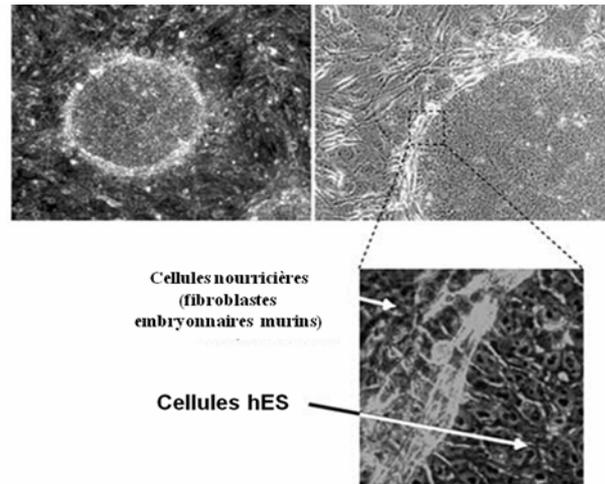


Figure 15: morphologie et culture des cellules souches

L'observation journalière de ces cellules à l'aide d'une loupe à contraste de phase ou d'un microscope à faible grossissement permet de suivre la croissance des colonies et de repérer une différenciation spontanée (**Figure 16**).

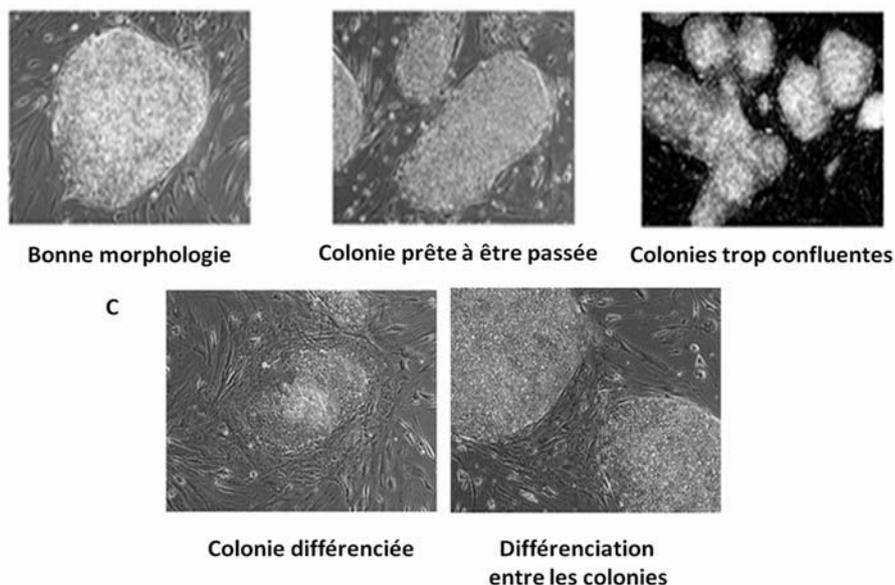


Figure 16: différents types de morphologie des hES au cours de la culture.

2.4.2 Maintien expérimental de l'état d'indifférenciation en culture

Dans la plupart des laboratoires, les cellules hES sont co-cultivées avec des lignées primaires ou immortalisées de cellules fibroblastiques murines (respectivement MEF ou STO) dont la prolifération est stoppée par l'utilisation de mitomycine C ou par irradiation. Ces lignées sécrètent des facteurs qui soutiennent l'état d'indifférenciation des hES en agissant par des effets paracrines (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998; Park, Kim et al. 2003). Une

alternative d'efficacité comparable consiste à cultiver les hES en présence de milieu conditionné par ces mêmes cellules nourricières (Xu, Inokuma et al. 2001). Par ailleurs, l'utilisation de matrices moléculaires artificielles telles que le matrigel, la laminine, la fibronectine ou des cocktails de protéines recombinantes permettent dans certains cas de s'affranchir de l'utilisation de cellules nourricières démontrant l'importance des interactions physiques matrice-cellules.

Les conditions de culture nécessitent également l'utilisation de sérum de veau foetal riche en facteurs de croissance (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998; Reubinoff, Itsykson et al. 2001), contrairement au sérum d'origine humaine qui semble avoir une efficacité plus faible (Richards, Fong et al. 2002; Rajala, Hakala et al. 2007).

L'objectif technologique actuel est le développement de conditions de culture entièrement définies exemptes de contaminants d'origine animale, notamment pour le développement d'applications de grade clinique. Des sérums de remplacement (KSR), dont la composition est définie, ont été développés afin de remplacer le sérum de veau foetal mais ils ne sont pas totalement exempts de produits d'origine animale puisqu'ils contiennent de l'albumine et de la transferrine bovine. (Amit, Carpenter et al. 2000; Koivisto, Hyvarinen et al. 2004; Strelchenko, Verlinsky et al. 2004; Stojkovic, Lako et al. 2005). Toujours avec ce même objectif, certains auteurs ont tenté de remplacer les cellules nourricières de souris par des cellules fœtales ou adultes d'origines humaines (Stacey, Cobo et al. 2006). Par exemple, des fibroblastes provenant de prépuce (cellules « foreskin ») ou des fibroblastes embryonnaires obtenus par différenciation des cellules hES elles-mêmes permettent d'établir un système de culture autogénique (Stojkovic, Lako et al. 2005; Mallon, Park et al. 2006). Malgré ces améliorations technologiques, l'efficacité des différentes lignées nourricières à maintenir l'état d'indifférenciation est variable et dépend principalement de l'effet paracrine des molécules qu'elles secrètent (Eiselleova, Peterkova et al. 2008).

Des analyses protéomiques des différents secrétomes de lignées de cellules nourricières ont permis d'identifier des facteurs efficaces sur la maintenance de l'identité des cellules hES.

Parmi ces facteurs, le FGF2 à fortes concentrations combiné avec de l'Activine A ou Nodal suffisent à cultiver les cellules hES en l'absence de cellules nourricières ou de milieu conditionné (Levenstein, Ludwig et al. 2006). D'autres molécules ont été utilisées dans les milieux de cultures définis par exemple le facteur de croissance de l'insuline (IGF-1) ou des inhibiteurs de la voie BMP, comme la protéine Noggin, qui préviennent la différenciation spontanée des cellules hES (**Figure 17**).

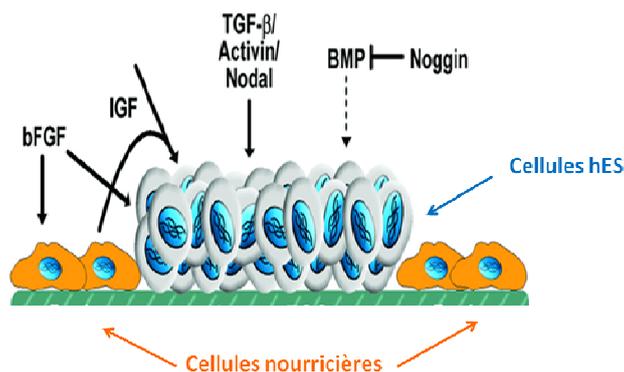


Figure 17 : Résumé des facteurs permettant le maintien des hES à l'état indifférencié en culture.

2.4.3 Passage des cellules

Il existe schématiquement deux méthodes pour passer les cellules hES : la dissociation mécanique utilisant un quadrillage réalisé avec l'aide d'une aiguille sous le contrôle d'une loupe binoculaire et la dissociation enzymatique par l'utilisation de trypsine, collagénase ou dispase. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients (**Tableau 3**).

	Transfert mécanique	Transfert enzymatique
Avantages	Idéal pour le maintien des cellules hES	Utile pour les applications nécessitant beaucoup de cellules
	Transfert sélectif des cellules hES indifférenciées (au centre de la colonie; les cellules à la périphérie ayant tendance à se différencier)	Plus rapide et plus facile que le transfert mécanique
Inconvénients	Laborieux et chronophage	Moins homogène ; colonies de formes et de tailles variables ; présence de mélanges cellulaires entre cellules hES+cellules en cours de différenciation + présence de cellules nourricières.
	Difficulté à traiter beaucoup de cellules simultanément	Probabilité augmentée d'anomalies chromosomiques (voir chapitre 2.5.5.)

Tableau 3 : Comparatif des avantages et inconvénients des deux méthodes utilisées pour le passage des cellules hES.

2.4.4 Marqueurs phénotypiques

Contrairement aux cellules souches adultes, les cellules hES maintenues à l'état indifférencié expriment les marqueurs spécifiques de pluripotence tels que les 3 facteurs de transcription clés *NANOG*, *OCT4* et *SOX2*. D'autres gènes sont aussi fréquemment utilisés pour estimer l'état d'indifférenciation des cellules dont *LEFTY*, *CRYPTO* ou *REX-1*. En plus de ces marqueurs nucléaires, un certain nombre de marqueurs membranaires de nature glucidique ont été identifiés tels que SSEA3, SSEA4, Tra-1-60 et Tra-1-81. A l'inverse, le suivi de l'expression de gènes précoces spécifiques d'un lignage donné permet d'apprécier, en cas de levée de l'état d'indifférenciation, le type de différenciation dans lequel les cellules hES se sont engagées.

2.4.5 Recherche d'anomalies caryotypiques ou génomiques

La stabilité génomique est l'une des caractéristiques des cellules hES cependant certaines conditions de culture à long terme exerce une pression sélective qui semble générer des anomalies chromosomiques. Par exemple, les cultures sans cellules nourricières ou encore l'utilisation de trypsine favoriseraient des aneuploïdies comme les trisomies 12 ou 17 (Brimble, Zeng et al. 2004; Hoffman and Carpenter 2005; Lefort, Perrier et al. 2009). La dissociation mécanique pourrait également entraîner des défauts mais plus focalisés (Lefort, Feyeux et al. 2008). Enfin les méthodes de congélation classiques utilisant le DMSO (*diméthylsulfoxyde*) en tant que cryopréservateur, sont connues pour affecter le profil épigénétique des cellules. De plus, la production de radicaux libres qui a lieu lors de tels cycles pourrait affecter la réplication de l'ADN ainsi que la structure des chromosomes. Ces changements pourraient conférer des avantages en termes de prolifération ou de survie pour certains clones entraînant une hétérogénéité intrinsèque dans les cultures. Aussi, il est nécessaire de contrôler régulièrement la stabilité génomique des cellules hES en effectuant au minimum des caryotypes classiques (bande-G) permettant d'apprécier les anomalies chromosomiques. Il existe d'autres méthodes de cytogénétique (FISH, mFISH) ou de biologie moléculaire (puce CGH ou à SNP) permettant de rechercher certaines anomalies, soit sans avoir d'*a priori*, soit en recherchant une modification bien précise.

2.4.6 Activité télomérasique

Les télomères sont des séquences d'ADN répétées en tandem du motif hexanucléotidique TTAGGG qui protègent et stabilisent l'extrémité des chromosomes eucaryotes (Blackburn 1991). Les quelques 200 nucléotides de leur extrémité 3' sont constitués d'ADN simple brin (de Lange 2002) et ne peuvent pas être répliqués par l'ADN polymérase au cours de la phase S de la mitose conduisant à leurs raccourcissements à chaque division. Trois biologistes américains, Carol Greider, Jack Szostak et Elizabeth Blackburn ont reçu le prix Nobel de médecine en 2009 pour avoir démontré que ce mécanisme était associé au vieillissement cellulaire (ou sénescence) (Yang, Di et al.). En effet, lorsque les télomères deviennent trop courts, les cellules perdent leurs capacités de se diviser. Dans la plupart des cellules somatiques, ce nombre de divisions est de l'ordre de 50, un seuil connue sous le nom de limite de Hayflick (Hayflick and Moorhead 1961). En revanche, dans les cellules souches qui ont la propriété de se diviser un très grand nombre de fois, la diminution de la longueur de télomère est compensée par un complexe ribonucléoprotéique dont l'activité enzymatique est portée par la télomérase constituée de deux sous-unités essentielles : la TERT (*telomerase reverse transcriptase*) et la TR (*telomerase RNA*) qui apporte la matrice d'ARN nécessaire pour générer de nouveaux motifs TTAGGG (Weinrich, Pruzan et al. 1997).

Les hES présentent une expression particulièrement élevée de la TERT associée à une forte activité télomérasique (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998) permettant le maintien de la longueur de leurs télomères (Carpenter, Rosler et al. 2004; Rosler, Fisk et al. 2004). En revanche, lorsque les cellules entrent en différenciation, elles perdent cette propriété (Armstrong, Lako et al. 2000). Ces données montrent que l'activité télomérasique est nécessaire aux cellules ES et représente un bon marqueur de l'état indifférencié.

2.4.7. Démonstration du caractère pluripotent

La propriété de pluripotence des cellules hES est généralement testée *in vivo* par injection dans la capsule testiculaire de souris immunodéficientes de type « nude ou scid ». Ces souris développent alors -si les cellules injectées sont pluripotentes- des tératomes caractérisés par la présence d'un mélange de tissus provenant d'au moins 2 des 3 feuilletts embryonnaires.

Le caractère pluripotent peut également être mis en évidence *in vitro*. La différenciation spontanée des hES conduit alors à la formation de corps embryoides constitués de différents

types cellulaires appartenant aux 3 feuillets embryonnaires comme cela est décrit ci-dessous (Heins, Englund et al. 2004).

2.5 Différenciation des cellules ES

Comme cela a été évoqué au début de ce chapitre, les cellules ES de part leurs propriétés de pluripotence sont capables de se différencier vers l'ensemble des types cellulaires de l'organisme. Il existe plusieurs stratégies expérimentales pour contrôler le choix du lignage des hES vers un phénotype donné :

- **la différenciation spontanée** : elle permet d'obtenir des structures tridimensionnelles, les corps embryoïdes, composée de nombreuses cellules de phénotypes différents. Il est ensuite possible d'effectuer une étape de sélection pour isoler des populations cellulaires particulières.
- **la différenciation guidée** : elle consiste à favoriser un lignage spécifique soit par l'utilisation de l'effet inducteur de certaines lignées stromales utilisés en co-culture, soit grâce à l'utilisation de petites molécules ou de protéines morphogéniques recombinantes modulant les voies de signalisation intervenant dans la différenciation.

2.5.1 Différenciation spontanée et formation de corps embryoïdes

Les cellules ES, lorsqu'elles sont mises en suspension dans un milieu contenant du sérum mais sans la présence des signaux permettant leur maintien à l'état indifférencié, se différencient spontanément en 3-4 jours en formant des agrégats de cellules que l'on appelle corps embryoïdes (EBs, embryoid bodies). Il existe au moins 3 méthodes principales pour les obtenir : la culture en suspension statique, la méthode de la goutte suspendue et la culture en système hydrodynamique, chacune de ces méthodes présentant ses avantages et ses inconvénients (Bratt-Leal, Carpenedo et al. 2009). Lors de la formation des EB, les cellules hES s'agrègent entre elles puis elles se différencient spontanément pour former une couche épithéliale d'endoderme primitif à sa surface extérieure (Maurer, Nelson et al. 2008). Cet épithélium forme une lame basale qui sépare l'écorce endodermique du reste de la structure (Li, Chen et al. 2001). Au fur et à mesure que l'EB se développe, de nombreuses cellules de phénotypes variés originaires des 3 feuillets embryonnaires apparaissent. Par exemple, la différenciation hématopoïétique est matérialisée par l'apparition de structure ressemblant aux îlots sanguins de la membrane vitelline. La différenciation vers les cardiomyocytes est aisément observable puisque des groupes de cellules se mettent à se contracter spontanément

(on parle alors de EB « battants »). Enfin, si l'on place ces EB sur un substrat adhérent, des projections neuritiques apparaissent témoignant d'une différenciation neuronale et des cellules endothéliales, fibroblastiques ou d'autres phénotypes cellulaires peuvent être identifiés. Les mécanismes qui gouvernent la différenciation en EB sont complexes et sont globalement inconnus. Ils aboutissent à un amas très hétérogène de cellules.

Pour pouvoir isoler une population d'intérêt, il va falloir utiliser une méthode de purification basée sur une sélection génique, sur des propriétés physiques, sur l'effet inducteur chimique de milieux spécifiques ou encore des petites molécules (**Figure 18**).

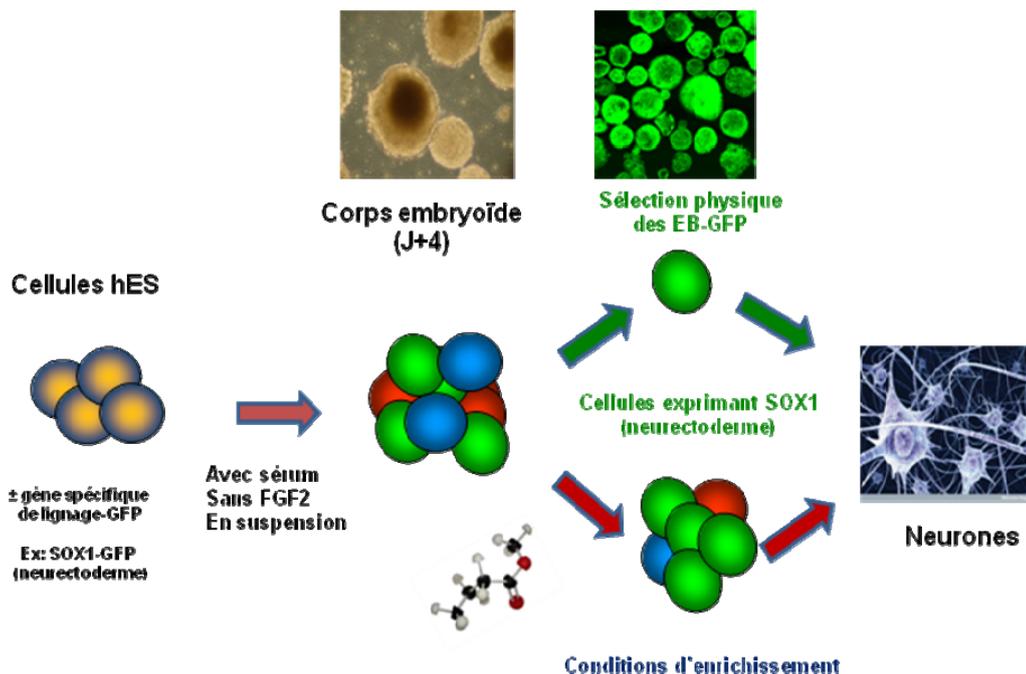


Figure 18 : Exemples de stratégies de différenciation basée sur l'utilisation des corps embryoides. Les cellules hES forment des corps embryoides après 4 jours de différenciation. Les boules rouges, vertes et bleues correspondent à des cellules originaires d'un feuillet embryonnaire différent.

Le principe de la sélection génique consiste à générer des cellules ES avec une construction contenant un promoteur spécifique de lignage sous le contrôle d'un gène rapporteur. A titre d'exemple, l'obtention de cellules hES exprimant la construction SOX1-GFP va permettre de sélectionner des précurseurs neuraux SOX1 positifs à partir des EB par tri cellulaire sur l'expression de la GFP (Chung, Shin et al. 2006). Une variante de cette technique consiste à modifier les cellules ES avec des promoteurs spécifiques de lignage contrôlant des gènes toxiques permettant l'enrichissement des cultures par sélection négative

des lignages indésirables. La sélection physique est basée sur l'expression de protéines de surface qui permet de trier positivement ou négativement des populations cellulaires par FACS. Enfin, il est possible, par sélection chimique, d'enrichir des populations particulières à l'aide de petites molécules. Par exemple, le traitement des EB avec de l'acide rétinoïque permet l'enrichissement des populations cellulaires en neurones (Carpenter, Inokuma et al. 2001).

2.5.2 Différenciation guidée

La différenciation guidée consiste à diriger expérimentalement les hES vers un phénotype cellulaire d'intérêt. Son principe est basé sur la notion que ces cellules se différencient *in vitro* en suivant l'ontogénèse embryonnaire (**Figure 19**).

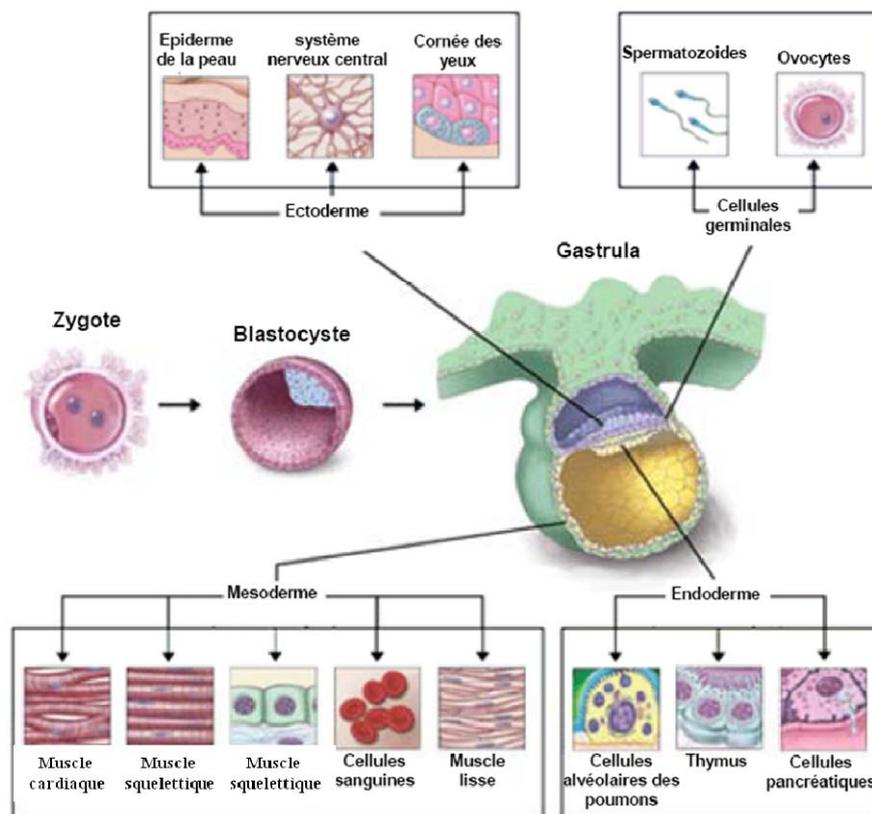


Figure 19 : Ontogénèse embryonnaire et potentialités de différenciation de la MCI.

Au cours de l'embryogénèse, le blastocyste évolue vers la gastrula qui représente un stade comprenant 3 feuillets embryonnaires, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme ainsi que les cellules de la lignée germinale. Ainsi pour diriger la différenciation des cellules hES vers l'un

des types cellulaires, il faut d'abord pouvoir les induire spécifiquement vers l'un des trois feuillet embryonnaires :

- **l'ectoderme** : il donnera l'épiderme, le système nerveux et les dérivés des crêtes neurales à l'origine de nombreux lignages dont le système nerveux périphérique, les mélanocytes, les cellules chromaffines de la médullo-surrénale.
- **le mésoderme** : il donnera tout ce qui se trouve entre l'épiderme et l'épithélium du tube digestif, c'est-à-dire le tissu conjonctif (ou du moins sa majeure partie), l'appareil locomoteur (muscle, squelette), l'appareil cardio-vasculaire (cœur, vaisseaux et sang), l'appareil uro-génital.
- **l'endoderme** : il donnera l'épithélium du tube digestif, l'arbre trachéo-broncho-pulmonaire ainsi que les glandes annexes du tube digestif (foie, pancréas) et la thyroïde.

Dans cette partie, les différents protocoles de différenciation guidée seront présentés selon cette hiérarchie embryonnaire, en faisant dans chaque cas un bref rappel du développement et des signaux morphogéniques connus *in vivo*.

2.5.2.1 Différenciation vers le lignage ectodermique

Dans l'embryon humain, au cours de la 3^{ème} semaine de développement, la gastrulation permet la mise en place, entre la couche épiblastique et l'hypoblaste, d'un feuillet de nature mésodermique. L'épiblaste devient l'ectoderme de surface qui produit un morphogène, le BMP4, permettant de générer le tissu épidermique recouvrant l'ensemble de l'embryon. Dans la région médiane sous jacente, une structure de nature mésodermique, la notochorde, produit un inhibiteur de ce BMP4 : la protéine Noggin. C'est dans cette région axiale de l'ectoderme que se développera le neurectoderme à l'origine de l'encéphale et de la moelle épinière. Enfin, dans la région intermédiaire entre l'ectoderme de surface et le neurectoderme se développe une population appelée « crête neurale » à l'origine à de nombreux types cellulaires (voir chapitre en 6.2.1.1.3).

2.5.2.1.1. Différenciation neurale

Le système nerveux central est constitué d'environ 10^{12} cellules, dont 90% sont des astrocytes. Les 10% restants représentent de nombreux sous-types de neurones et les oligodendrocytes. Malgré cette diversité morphologique et fonctionnelle, ces cellules ont une

origine commune et dérivent de progéniteurs neuroectodermiques multipotents (les NEPs) qui sont présents dans le neuroépithélium cylindrique qui constituent, au cours de la 4^{ème} semaine du développement embryonnaire chez l'Homme, la plaque neurale puis le tube neural.

La première étape du protocole de différenciation guidée des cellules hES vers ce lignage est appelée induction neurale et consiste à favoriser l'enrichissement de ces cultures en NEPs.

Il existe plusieurs méthodes expérimentales (**Figure 20**).

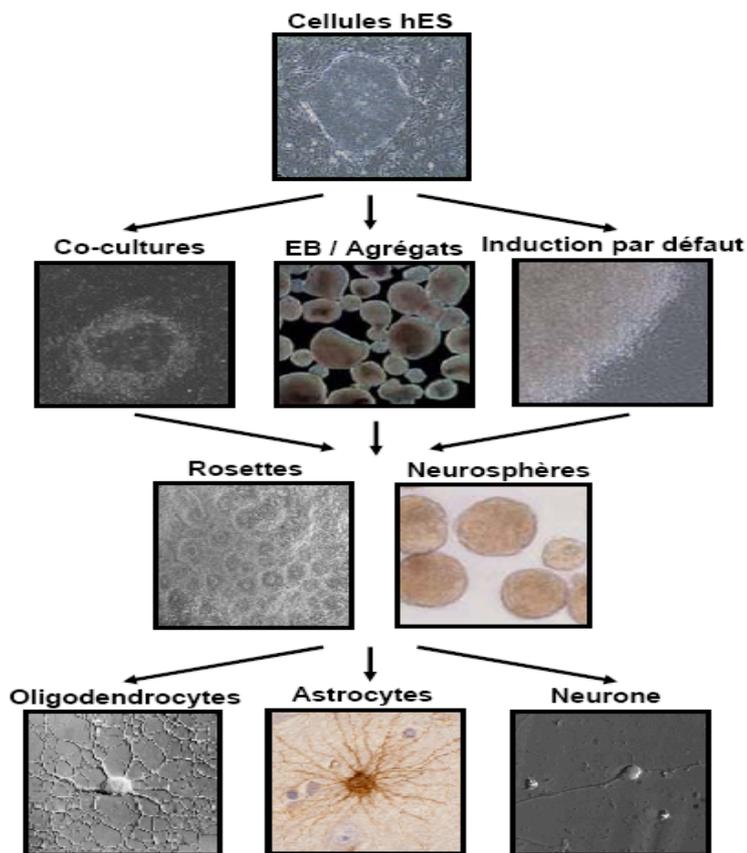


Figure 20 : Principales méthodes utilisées pour l'induction dans la voie neurale.

(1) **l'induction par défaut** : elle consiste à cultiver les cellules à forte densité, en l'absence de sérum, jusqu'à l'apparition d'agrégats cellulaires en suspension appelés neurosphères (Reubinoff, Itsykson et al. 2001).

(2) **la co-culture avec des cellules nourricières stromales** : elle est connue dans la littérature sous le terme de SDIA pour « *Stromal Differentiation Inducing Activity* » (Kawasaki, Mizuseki et al. 2000; Perrier, Tabar et al. 2004).

(3) **l'utilisation de petites molécules ciblant les voies de signalisation** : elle inclue l'utilisation de la protéine Noggin dont nous avons déjà parlé, qui inhibent la voie des BMPs (Pera, Andrade et al. 2004) et le SB431542, une petite molécule synthétique, qui inhibe la phosphorylation des récepteurs de l'Activine et du TGFβ (Chambers, Fasano et al. 2009). Ces deux facteurs agissent en synergie pour augmenter l'enrichissement en cellules neurales (Chambers, Fasano et al. 2009).

Au cours de ce protocole d'induction, hormis si les cellules sont cultivées en suspension, les cellules hES présentent des modifications morphologiques majeures qui se caractérisent par la formation d'un épithélium cylindrique organisé radialement appelée rosettes neurales. Ces structures contiennent des progéniteurs neuro-épithéliaux semblables aux NEPs et reproduisent l'aspect en deux dimensions d'une coupe transversale du tube neural évoqué ci-dessus (Zhang, Wernig et al. 2001; Perrier, Tabar et al. 2004).

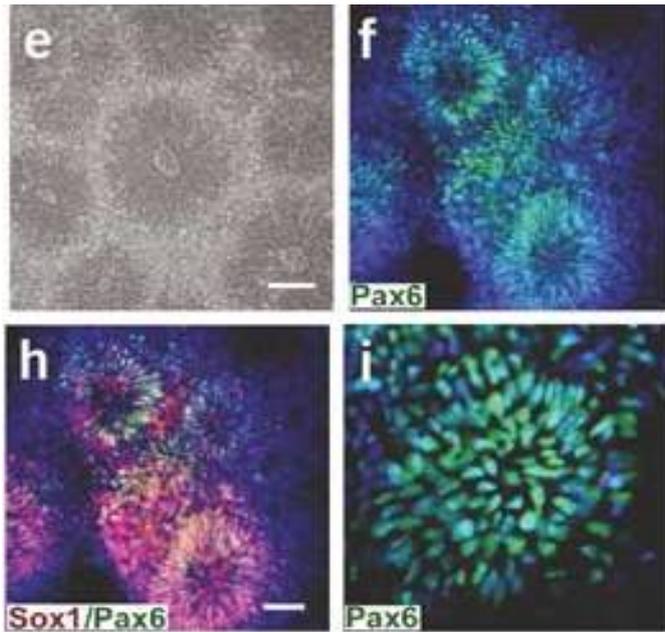


Figure 21 : Cellules neurales obtenues à partir de cellules hES

Elles s'organisent en rosettes neurales évoquant la coupe transversale d'un tube neural. Aspect morphologique typique en microscopie par contraste de phase (e). Les cellules à l'intérieur des rosettes sont positives pour les facteurs de transcription *PAX6* et *SOX1* (f-h-i).

(D'après Li, Du et al. 2005).

Les rosettes neurales expriment des marqueurs neurectodermiques comme les facteurs de transcription *PAX6* et *SOX1* (**Figure 21**) et sont compétentes pour répondre à des signaux développementaux leur permettant de se différencier en différents types de neurones et en cellules gliales (Perrier, Tabar et al. 2004; Li, Du et al. 2005). La seconde étape du protocole de différenciation guidée vers un sous-type neuronal donné est appelée régionalisation des progéniteurs neuraux. *In vivo*, les cellules neuroépithéliales contenues dans le tube neural ne sont pas toutes équivalentes et acquièrent une identité différente le long de :

- **l'axe dorso-ventral** : le gradient de BMP4 sécrété par les cellules les plus dorsales et le gradient de Sonic hedgehog (Shh) sécrété par le chordo-mésoderme en position ventrale sont responsables de cette régionalisation.
- **l'axe antéropostérieur** : la voie des Wnt ainsi que la voie du FGF et de l'acide rétinoïque sont impliquées.

C'est l'intégration de ce codage chimique positionnel qui permet la régionalisation du tube neural et déclenche l'activation de réseaux de gènes spécifiques définissant leur identité propre et leur capacité de différenciation. De manière remarquable, il est possible de mimer *in vitro* cette régionalisation en exposant les progéniteurs neurectodermiques contenus dans les rosettes neurales aux mêmes facteurs, reproduisant ainsi l'activation des gènes spécifiques de ce processus (Cazillis, Rasika et al. 2006).

La dernière étape, appelée différenciation terminale, permet à partir de progéniteurs régionalisés d'obtenir de nombreux types de cellules neurales spécialisées (**Figure 22**).

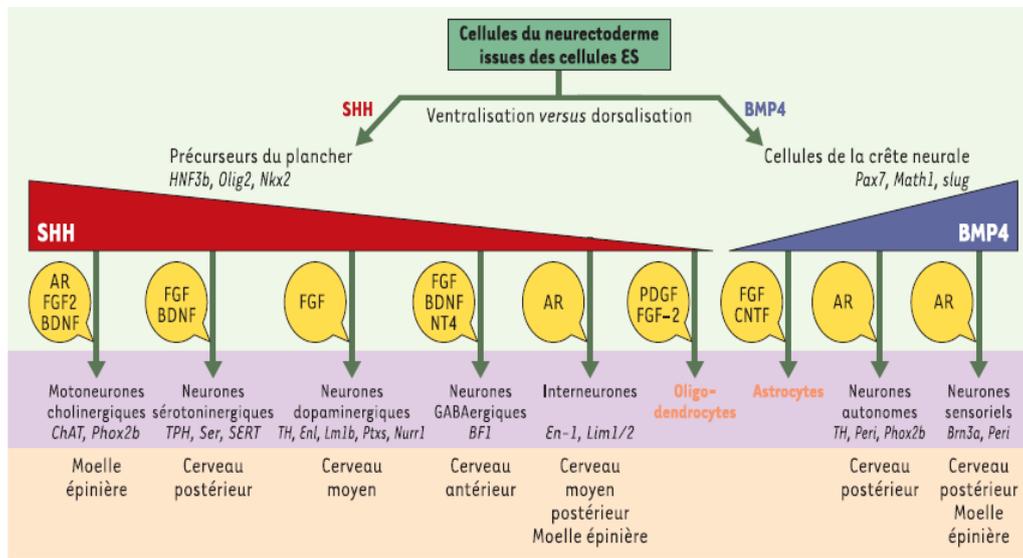


Figure 22 : Différenciation des progéniteurs neurectodermiques issus des cellules ES dans différents types de cellules neurales.

L'action opposée de Sonic hedgehog (Shh) et de BMP4 sur les progéniteurs neurectodermiques conduit à la production de cellules précurseur du plancher et de cellules de la crête neurale. Les marqueurs spécifiques des différents types cellulaires sont en italiques. Les types de neurones sont placés selon le gradient de concentration SHH qui permet l'acquisition de leur identité. La localisation embryonnaire correspondant à l'identité acquise par les cellules issues des cellules ES est indiquée sous les différents neurones. Le schéma montre que la différenciation des cellules ES en neurones reproduit la différenciation spatio-temporelle obtenue au cours du développement embryonnaire *in vivo*. Les acteurs de différenciation sélectifs (FGF, BDNF, NT4, PDGF, CNTF, AR) sont indiqués dans les bulles jaunes. (*D'après Cazillis, Rasika et al. 2006*).

2.6.2.1.2 Différenciation épidermique

La différenciation des cellules hES vers l'épiderme comprend plusieurs étapes successives : l'induction vers le lignage ectodermique suivi de la différenciation en kératinocytes exprimant les kératines K5/K18 et enfin la stratification permettant la reconstitution des différentes couches de l'épiderme complet. Ce protocole a pu être mis au point grâce à certains travaux de biologie du développement réalisés chez le Xenope. Ils ont permis à Brivanlou et Melton de proposer l'hypothèse dite de « l'induction neurale par défaut », basée sur le fait que les régions de l'ectoderme contenant du BMP4 empêchaient l'induction neurale en favorisant la voie épidermique (Hemmati-Brivanlou and Melton 1997). Parmi les gènes clés contrôlant en aval cette différenciation épidermique en réprimant la différenciation neurale, la protéine p63, un homologue du facteur de transcription p53, est

l'une des cibles majeures. L'extinction de ce gène chez le poisson zèbre et chez la souris entraîne d'importantes anomalies structurales de la peau (Bakkers, 2002; Candi, 2006). Par ailleurs, cette protéine présente deux isoformes qui semblent avoir des rôles distincts au cours de la différenciation épidermique :

- **TAp63** : il est nécessaire à l'engagement embryonnaire des cellules ectodermiques vers le lignage kératinocytaire.
- **ΔNp63** : il est impliqué dans la stratification épidermique (Candi, Dinsdale et al. 2007).

Sur la base de ces données embryonnaires, plusieurs études *in vitro* ont démontré la possibilité de guider la différenciation des cellules ES vers ce lignage en les traitant par du BMP4 recombinant. Ce protocole permet de diminuer le nombre de cellules exprimant la Nestine (marqueur neural) et d'augmenter en parallèle le nombre de cellules exprimant K14 (marqueur de l'épiderme) (Kawasaki, Mizuseki et al. 2000).

En 2006, l'équipe de Daniel Aberdam a démontré que le traitement par le BMP4 de cellules ES de souris entraînait une apoptose importante des progéniteurs neuraux favorisant ainsi leur engagement dans le lignage épithélial. Dans la même étude, ces chercheurs ont associé cet effet pro-apoptique de la BMP4 à l'inhibition de Smad6 et au clivage de la caspase 3 (Gambaro, Aberdam et al. 2006).

Très récemment, une équipe de notre laboratoire a mis au point un protocole de différenciation des cellules hES qui reproduit l'ensemble des étapes observées *in vivo*. Il aboutit à l'obtention de kératinocytes capables de reconstruire un épiderme complet à la fois *in vitro* mais aussi *in vivo* lorsque ces cellules sont greffées dans des souris immunodéprimées (Nissan, Denis et al., 2011; Guenou, Nissan et al. 2009) (**Figure 23**).

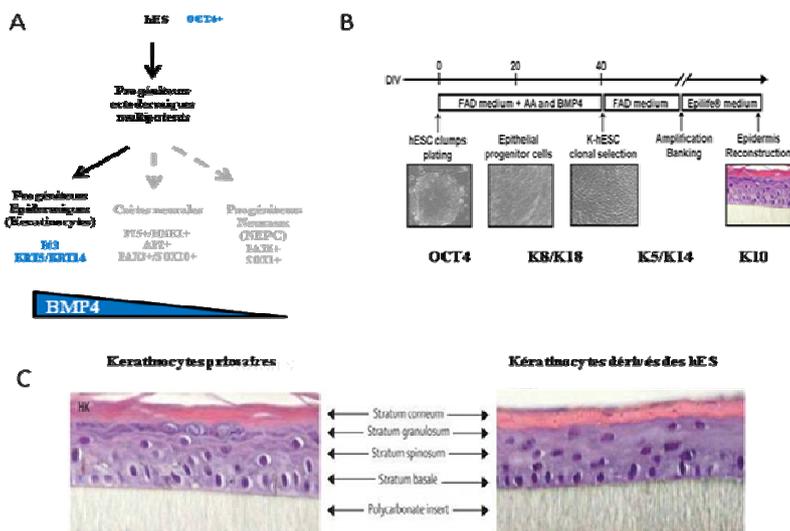


Figure 23 : Différenciation des cellules hES vers le lignage épidermique.

(A) L'utilisation de BMP4 permet de diriger la différenciation des hES vers des kératinocytes. (B) Protocole d'obtention de kératinocytes fonctionnels. La différenciation est accompagnée de l'expression séquentielle de kératines K8/K18 puis K5/K14 et K10 dans l'épiderme reconstruit. (C) Les kératinocytes dérivés à partir des hES sont capables de reconstituer un épiderme identique à celui issu de lignées primaires de kératinocytes. DIV= Day *in vitro*.

2.5.2.1.3 Différenciation vers les crêtes neurales

Les cellules de la crête neurale sont des progéniteurs multipotents qui peuvent donner naissance à de nombreux types cellulaires incluant les neurones et les cellules gliales du système nerveux sensoriel sympathique et parasympathique, les cellules de la glande médullosurrénale qui produisent l'adrénaline, les cellules pigmentées de l'épiderme et plusieurs composants du squelette et du tissu conjonctif de la tête (**Figure 24**).

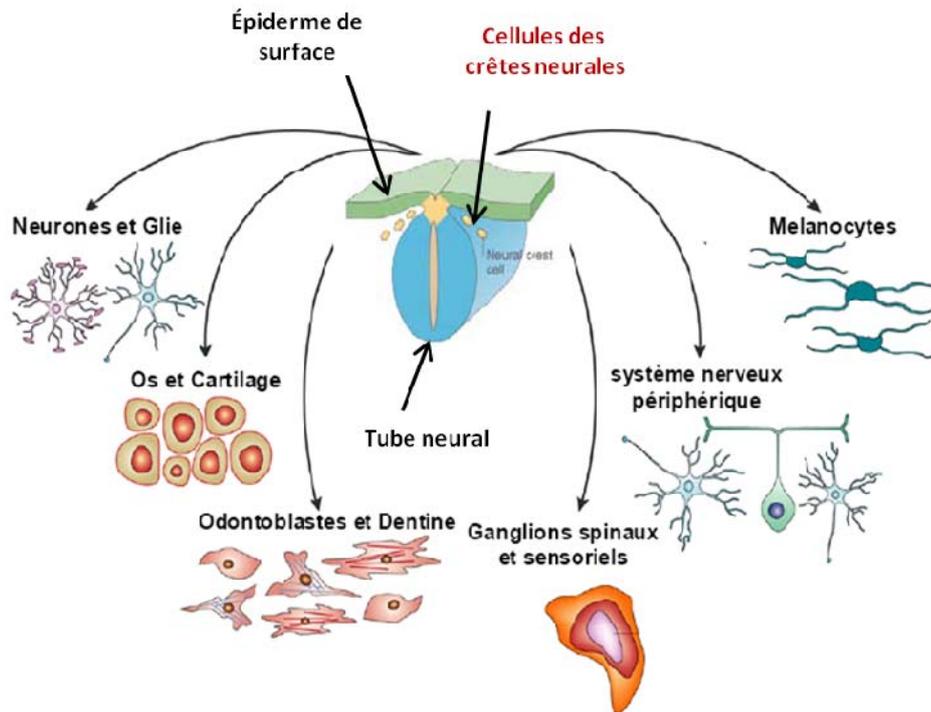


Figure 24: Progénies des cellules des crêtes neurales. (Adapté de Aaron J. et al 2008).

Très récemment, l'équipe de Lorentz Studer au Sloan-Kettering Institute à New-York a mis au point un protocole de culture permettant de diriger la différenciation des cellules hES vers ce type de progéniteurs (Lee, Chambers et al.; Lee, Kim et al. 2007). Cette équipe a montré que les cellules qui bordent les rosettes neurales sont composées de progéniteurs ayant un phénotype de crête neurale et expriment le marqueur p75, HNK1 et AP2. Ces mêmes auteurs ont également montré que l'exposition des rosettes aux signaux morphogéniques Wnt1, FGF2 ou BMP2 permettait d'augmenter le nombre de cellules p75+ (**Figure 25**).

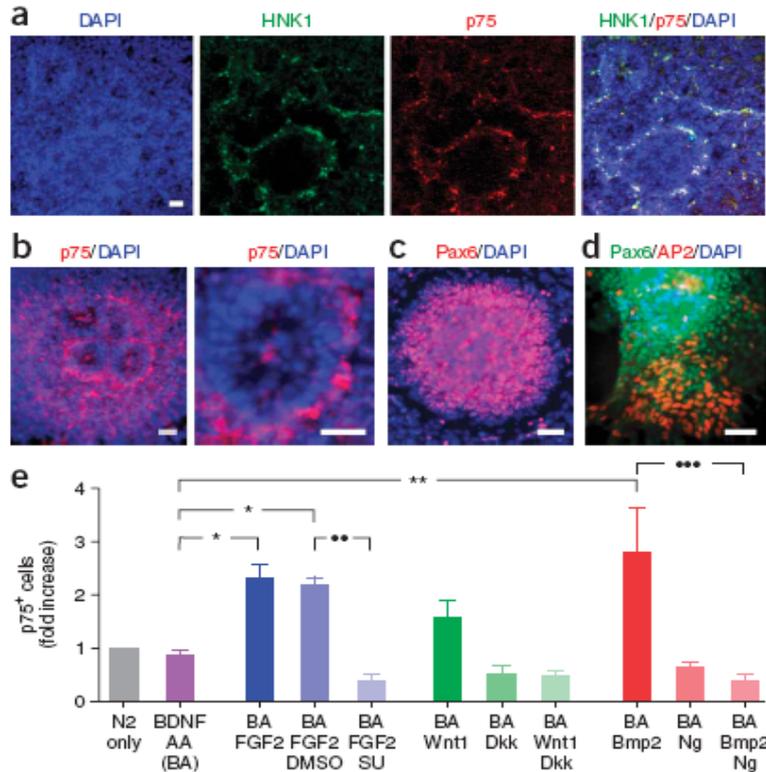


Figure 25 : Dérivation de progéniteurs des crêtes neurales à partir des cellules hES.

(a-b) Immunomarquage montrant la présence de progéniteurs des crêtes neurales positives pour les protéines p75 (en rouge) et HNK1 (en vert) autour des rosettes neurales. (c) Les progéniteurs neurales positifs pour le marqueur PAX6 sont à l'intérieur des rosettes neurales. (d) AP2 (en rouge) marque les progéniteurs en cours de migration. Les noyaux sont marqués par le DAPI. (e) Influence du FGF2, de Wnt1 et du BMP2 et de leurs inhibiteurs respectifs sur le nombre de cellules positives pour le marqueur P75. (*D'après Lee, 2007*).

Ces deux protéines membranaires ont permis de trier ces cellules par FACS et de les purifier. Ces cellules se sont révélées capables de se différencier en cellules spécialisées incluant des neurones périphériques (periphérin+/mash1+ ou Brn3a+), des cellules de Schwann (GFAP/Sox10) et des cellules mésenchymateuses (CD73+).

D'autres protocoles sont en cours de développement. Par exemple, une équipe australienne propose l'utilisation d'un inhibiteur de la voie effectrice des ROCK I/II, le Y27632 pour permettre l'augmentation de l'efficacité de différenciation en cellules présentant un phénotype de cellules des crêtes neurales, capable de migrer après transplantation dans un embryon de poulet et de se différencier en neurones entériques (Hotta, Pepdjonovic et al. 2009).

Enfin, il est également intéressant de noter que cette année le laboratoire I-Stem a pu mettre au point un protocole de différenciation guidée des cellules hES et hiPS vers les mélanocytes (l'une des progénies issue des crêtes neurales) (Nissan, Larribere et al., 2011).

2.5.2.2. Différenciation mésodermique et endodermique

Les cellules hES peuvent également être différenciées en cellules d'origine mésodermique ou endodermique (**Tableau 4**).

Origine	Phénotypes cellulaires	Référence
Mésoderme	cellules hématopoïétiques	(Kaufman 2009)
	cellules endothéliales	(James, Nam et al.)
	cellules mésenchymateuses	(de Peppo, Svensson et al.; Mahmood, Harkness et al.; Barberi, Willis et al. 2005; Mateizel, De Becker et al. 2008)
	Chondrocytes	(Gong, Ferrari et al.; Toh, Lee et al.; Bigdeli, Karlsson et al. 2009)
	cardiomyocytes	(Vidarsson, Hyllner et al., 2011)
	muscle lisse	(Vo, Hanjaya-Putra et al., 2011)
Endoderme	hépatocytes	(Cai, Zhao et al. 2007; Chiao, Elazar et al. 2008)
	cellules pancréatiques β	(Shi; Hay, Zhao et al. 2007; Zhang, Jiang et al. 2009)

Tableau 4: Exemples de phénotypes cellulaires d'origine mésodermique ou endodermique obtenus par différenciation guidée des cellules hES.

Les cellules hématopoïétiques et cardiaques représentent les types cellulaires les mieux documentés. Il faut toutefois noter que certaines différenciations restent très peu efficaces, comme par exemple pour le muscle strié squelettique (Barberi, Willis et al. 2005; Zheng, Wang et al. 2006).

De manière similaire à ce que l'on a décrit précédemment pour le lignage ectodermique, de nombreux protocoles ont été développés pour chacun de ces phénotypes en utilisant soit des co-cultures avec des lignées nourricières aux propriétés inductrices soit une sélection à partir des EBs. Ainsi, des précurseurs hématopoïétiques dérivés des cellules hES ont pu être obtenus dès 2001 par co-culture avec des cellules de moelle osseuse ou des cellules dérivées du cordon ombilical (Kaufman, Hanson et al. 2001). Les cellules hES ainsi cultivées se différencient à la fois en cellules de type endothélial et en précurseurs hématopoïétiques caractérisés par l'expression respective des marqueurs CD31 et CD34. La population exprimant le marqueur CD34 est capable de donner des colonies de cellules de type érythroïde et myéloïde. Une autre étude réalisée à partir de corps embryotiques traités avec

plusieurs cytokines montre la possibilité de dériver des précurseurs hématopoïétiques (CD34+ et CD45+) (Chadwick, Wang et al. 2003).

Les cellules hES peuvent également se différencier en cellules cardiaques objectivées par l'apparition au sein des corps embryoides de zones « battantes » dans lesquelles les cellules se contractent. Après microdissection de ces régions, Kehat et ses collègues ont montré que ces cellules présentaient des propriétés de cellules cardiaques fœtales et néonatales, comme en témoignent leur organisation myofibrillaire, la répartition subcellulaire des jonctions « gap » et leur activité électrique (Kehat, Kenyagin-Karsenti et al. 2001). Ces cellules expriment des marqueurs spécifiques des cellules cardiaques telles que la Troponine Ic, la chaîne lourde alpha de la myosine et un certain nombre de facteurs de transcription dont *Nkx2.5*, *GATA4* et *MEF2A*. La caractérisation de cette population a ensuite été complétée par des études d'électrophysiologie et par l'analyse de l'ultrastructure formée par ces cellules (Kehat, Gepstein et al. 2002; Snir, Kehat et al. 2003).

En ce qui concerne le lignage endodermique, il avait été montré dès 2001 que les corps embryoides dérivés des cellules hES étaient capables de sécréter de l'insuline. Cette hormone est physiologiquement produite par les cellules β du pancréas endocrine qui ont une origine endodermique (Assady, Maor et al. 2001). La différenciation vers ce lignage est complexe et les protocoles disponibles conduisent à des populations cellulaires mixtes de nature méso-endodermique. Par exemple, l'utilisation de co-cultures avec des cellules nourricières de souris de type END-2 conduit à la fois à des cardiomyocytes immatures regroupés sous forme de zones battantes mais aussi à des cellules exprimant des marqueurs de l'endoderme viscéral.

Beaucoup plus récemment, les connaissances acquises sur la différenciation méso-endodermique a progressé de manière importante. Une nouvelle fois, ce sont les connaissances concernant les morphogènes intervenant *in vivo* au cours de la gastrulation qui ont permis d'améliorer les protocoles de différenciation guidée des cellules hES.

Au cours de ce processus développemental, des cellules se détachent de l'épiblaste et s'invaginent le long d'une structure médiane appelée, la ligne primitive (**Figure 26**).

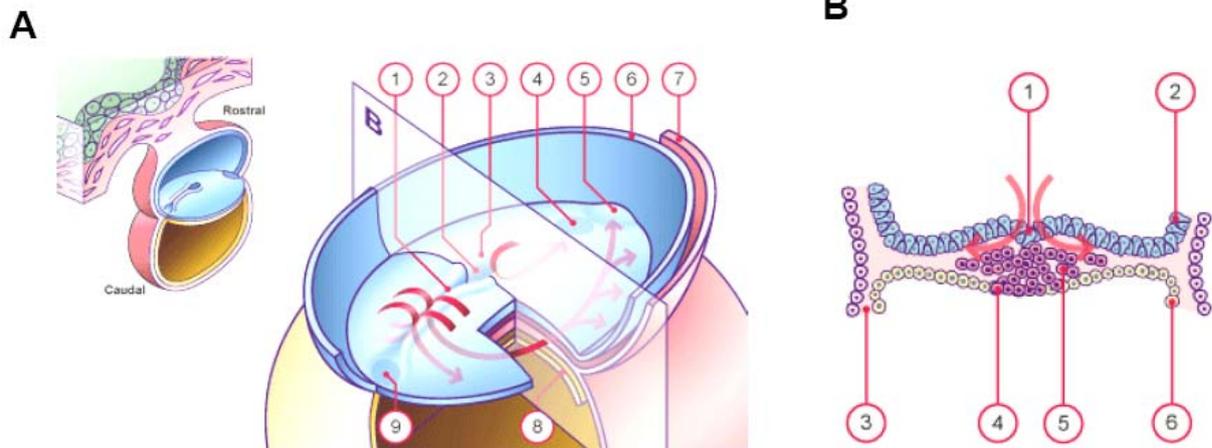


Figure 26: Mise en place de la ligne primitive de l'embryon et formation du troisième feuillet cellulaire lors de la gastrulation

(A) Disque embryonnaire (15 jours de développement) vu par sa face supérieure (dorsale). Les flèches rouges représentent schématiquement la migration des cellules épiblastiques vers leurs territoires présomptifs : (1) ligne primitive ; (2) dépression primitive ; (3) nœud de Hensen ; (4) membrane oropharyngée ; (5) aire cardiaque ; (6) bord sectionné de l'amnios ; (7) mésoderme ; (8) endoderme ; (9) ligne primitive. (B) Section transversale au niveau de la ligne primitive au moment de la gastrulation montrant l'invagination des cellules épiblastiques formant le futur mésoblaste : (1) ligne primitive ; (2) épiblaste ; (3) mésoblaste extra-embryonnaire ; (4) entoblaste définitif ; (5) invagination des cellules formant le futur mésoblaste ; (6) hypoblaste.

Adapté de www.embryology.ch. Copyright : Dr. A Senn et al, CHUC Lausanne.

Les premières cellules mobilisées migrent de manière postérieure et forment le mésoderme extra-embryonnaire à l'origine des annexes comme l'amnios, l'allantoïde et les cellules de la paroi du sac vitellin composées de cellules hématopoïétiques, endothéliales et du muscle lisse vasculaire. Dans un second temps, d'autres cellules migrent de manière plus antérieure pour former le mésoderme cranial et cardiaque ainsi que le mésoderme axial et paraxial. Enfin, les dernières cellules à migrer forment l'endoderme définitif. Ces étapes développementales sont fortement régulées de manière spatio-temporelle créant ainsi des microenvironnements qui contrôlent la différenciation vers des lignages spécifiques. Bien que la régulation précise de ces étapes ne soit pas entièrement comprise, différentes analyses d'expression génique et d'études de gain ou de perte de fonction ciblées sur certains gènes ont été réalisées chez la souris. Elles ont permis d'impliquer des membres de la famille du TGF β incluant le BMP4 et Nodal. (Hogan, 1996; Conlon et al., 1994; Schier, 2003) ainsi que différents membres de la famille des Wnt (Yamaguchi, 2001).

La manipulation *in vitro* de ses voies de signalisation permet de contrôler cette différenciation vers des lignages cellulaires différents (Murry and Keller 2008). La première

étape consiste à obtenir des progéniteurs de la ligne primitive qui expriment le facteur de transcription *brachyury*. Ces protocoles nécessitent soit du sérum, riche en facteurs de croissance et cytokines, soit des activateurs de la voie Wnt et de l'Activine A. Dans un second temps et de manière similaire à ce que l'on a décrit plus haut pour le lignage neurectodermique, il est possible de régionaliser ces progéniteurs de la ligne primitive selon un axe antéro-postérieur permettant l'enrichissement ultérieur des cultures vers les principaux phénotypes d'origine mésodermique ou endodermique par pression sélective de différentes molécules (**Figure 27**).

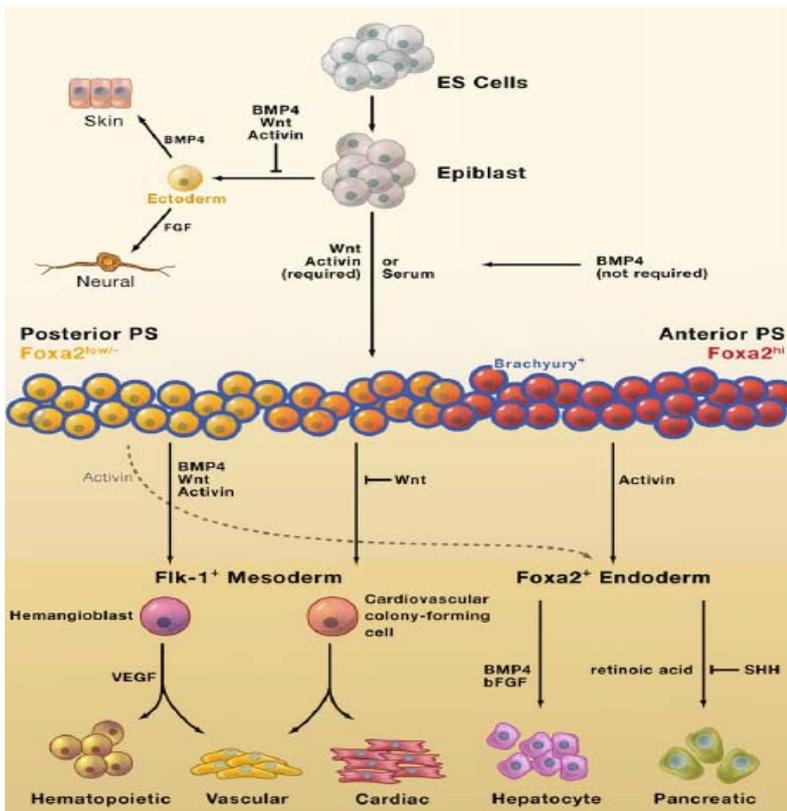


Figure 27 :

Modèle d'induction méso-endodermique des mES.

La première étape est la formation de cellules ressemblant à l'épiblaste de l'embryon murin. Une fois activées par wnt, activine, BMP4 ou du sérum, ces cellules génèrent une population cellulaire ressemblant à la ligne primitive (PS). Cette population cellulaire est régionalisée selon un profil d'expression identique à l'axe antéro-postérieur *in vivo*. Les cellules de profil antérieur (en rouge) expriment fortement FOXA2 alors que les cellules de profil postérieur (en jaune) l'expriment plus faiblement. En fonction de ces différents signaux, les cellules sont ensuite capables de se différencier vers des populations cellulaires différentes d'origine mésodermique ou endodermique. (Adapté de Murry and Keller 2008).

En conclusion, de nombreux protocoles permettant d'induire la différenciation des cellules hES vers différents phénotypes cellulaires ont été décrits ouvrant ainsi la voie à de nombreuses applications dont nous parlerons plus loin. Toutefois, il est nécessaire de poursuivre l'effort de recherche entrepris dans la mise au point de ces protocoles qui, pour la plupart, ne sont pas encore optimisés.

Second chapitre : Intérêts médicaux et pharmaceutiques des cellules souches pluripotentes

Les propriétés des cellules souches pluripotentes humaines que nous venons de décrire permettent des applications variées. Elles peuvent être utilisées *in vivo* comme « médicament » en étant implantées dans le corps des patients dans le cadre de thérapie cellulaire ou utilisée *in vitro* soit en recherche fondamentale permettant une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques de la différenciation, soit pour la recherche de nouveaux médicaments. Chacune de ces applications contribue à l'étude et au traitement des maladies humaines (**Figure 28**).

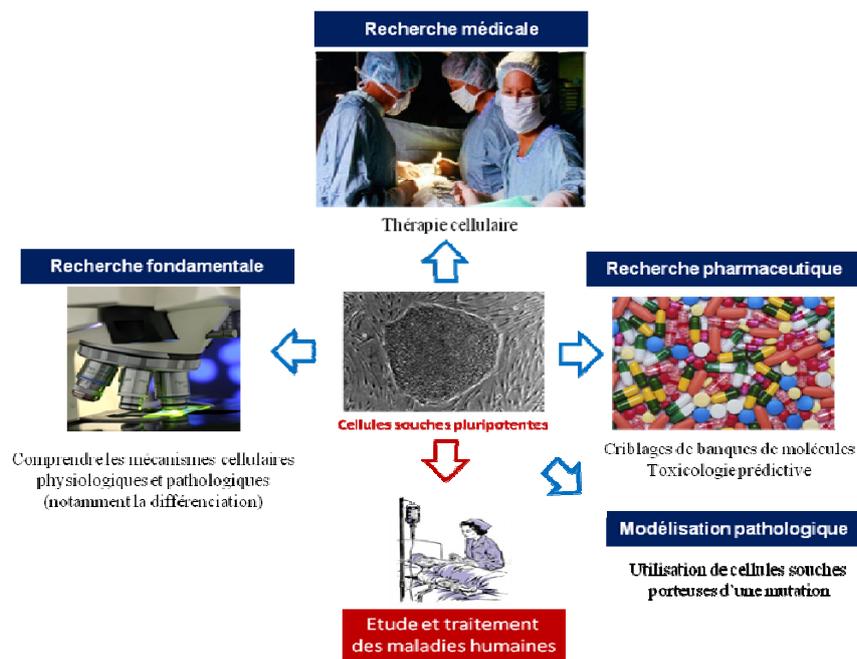


Figure 28 : Applications proposées pour l'utilisation des cellules souches pluripotentes à des fins thérapeutiques

Dans la suite de ce texte, les différentes applications proposées ci-dessus seront développées et illustrées par l'actualité scientifique particulièrement riche.

1. Thérapie cellulaire

1.1. Principe et état d'avancement des applications des cellules souches en thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste à implanter des cellules exogènes vivantes dans le but de prévenir, atténuer ou traiter des traumatismes ou des maladies.

Il existe 2 stratégies principales :

- **la thérapie cellulaire substitutive** : elle concerne l'implantation de cellules saines pouvant produire une substance nécessaire à l'organisme ou influencer sur son microenvironnement de façon à moduler une réponse physiologique, par exemple la réponse immunitaire.
- **la thérapie cellulaire régénératrice** : l'utilisation de cellules (principalement des cellules souches) pouvant se substituer aux cellules ciblées dans le but de reconstituer un tissu ou un organe défaillant. C'est ce que l'on appelle la thérapie cellulaire régénératrice.

Les applications cliniques de la thérapie cellulaire sont plus ou moins développées en fonction de la source de cellules utilisées. Excepté dans le cas des cellules souches hématopoïétiques (CSH), leurs utilisations thérapeutiques restent encore très limitées, en particulier pour les cellules souches pluripotentes.

Depuis plus de 10 ans, l'utilisation des CSH a donné des résultats satisfaisants qui ont débouché sur des applications cliniques majeures. Ces cellules ont été obtenues à partir de sang périphérique ou de la moelle osseuse et sont indiquées dans le traitement de nombreuses pathologies, principalement en onco-hématologie comme par exemple la leucémie, le lymphome, le myélome ou pour le traitement des hémoglobinopathies comme la drépanocytose ou les thalassémies. Depuis quelques années, l'accès à d'autres sources de CSH, comme le sang de cordon ou le sang placentaire, se développe de manière importante.

Les applications utilisant d'autres types de cellules souches adultes sont plus restreintes mais les lancements d'essais cliniques se sont multipliés ces dernières années. Ils concernent un peu moins de 200 produits en cours de développement dans le monde dont environ la moitié vise les maladies cardiovasculaires, mais aussi des indications dans les soins cicatriciels des plaies et les traitements des maladies du cartilage et de l'os (**Figure 29**).

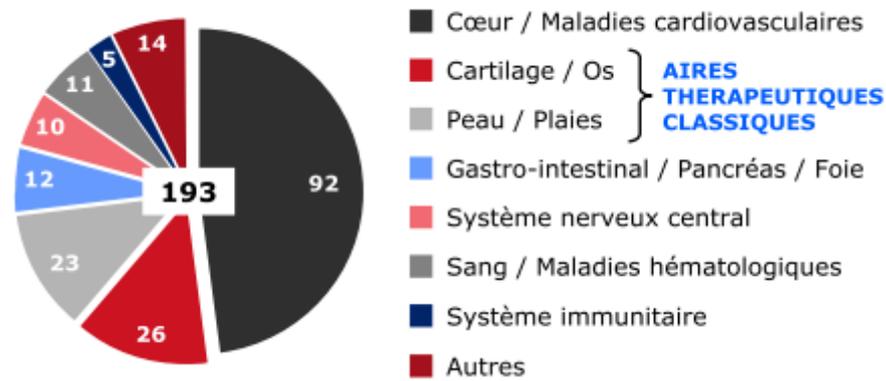


Figure 29 : répartition des produits de thérapie cellulaire par type d'indication au niveau mondial actuellement en phase d'essai clinique. Source: *Institute for Science and Society, April 2009, clinicaltrials.gov, analyse Bionest Partners*

Les cellules souches mésenchymateuses occupent une place toute particulière. En effet, elles sont capables de se différencier en plusieurs types cellulaires mais aussi de moduler la réponse immunitaire trouvant des applications dans le traitement anti rejet ou de sécréter des facteurs solubles modulant la prolifération et la différenciation cellulaire (Garcia-Castro, Trigueros et al. 2008). D'autres types de cellules souches adultes sont actuellement utilisés dans les essais cliniques comme des myoblastes, qui sont les cellules souches du muscle strié squelettique, pour des indications dans le traitement des ischémies cardiaques sévères (Menasche, Alfieri et al. 2008) mais aussi des neuroblastes fœtaux indiqués dans certaines maladies neurodégénératives (Peschanski, Hantraye et al. 2000; Peschanski 2001) notamment dans la maladie de Parkinson (Peschanski 2000) ou la maladie d'Huntington (Bachoud-Levi 2009).

L'expérience acquise lors de ces essais cliniques apporte la preuve de concept de l'efficacité de la thérapie cellulaire. Toutefois la limitation de l'accès à ces ressources biologiques ainsi que les méthodes de préparation des greffons et la variabilité dans les résultats obtenus ont conduit au développement de nouvelles stratégies basées notamment sur l'utilisation de cellules pluripotentes.

1.2 Thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des cellules pluripotentes

Les cellules pluripotentes (hES ou hiPS) de part leurs propriétés représentent une source biologique alternative prometteuse pour la thérapie cellulaire. Les principales études cliniques actuellement en cours sont présentées dans le **tableau 5** ci-dessous.

PHÉNOTYPE DES CELLULES THÉRAPEUTIQUES	MALADIE	COMPAGNIE/ LABORATOIRE	PAYS
Précurseurs d'oligodendrocytes	Traumatisme de la moelle épinière	<i>Géron Corporation</i>	États-Unis
Précurseurs des cellules <i>beta</i> du pancréas (insuline)	Diabète (cellules encapsulées)	<i>Novocell</i>	États-Unis
Précurseurs de l'épithélium pigmentaire de la rétine	Dégénérescence maculaire liée à l'âge		États-Unis et Royaume-Uni
Précurseurs de cardiomyocytes	Insuffisance cardiaque ischémique	Inserm/APHP	France
Précurseurs de l'épithélium pigmentaire de la rétine	<i>Stargardt's macular dystrophy (SMD)</i>	<i>Advanced Cell Technology</i>	États-Unis phase I-II Muticentrique (FDA approved)

Tableau 5 : rapport de l'Agence de la biomédecine au Parlement et au Gouvernement avril 2010

Comme nous l'avons déjà signalé, la greffe directe de cellules souches pluripotentes n'est pas envisageable puisque ces cellules, une fois greffées, se différencient spontanément en une masse cellulaire composée de cellules de différentes origines embryologiques, le tératome.

Le pré-requis pour pouvoir utiliser ces cellules hES (ou les hiPS) est leur différenciation guidée vers le type cellulaire d'intérêt par rapport à la pathologie à traiter. Ces cellules doivent en outre démontrer leur fonctionnalité : par exemple une cellule des îlots β de Langerhans doit être capable de produire de l'insuline, un neurone doit être capable de générer des potentiels d'action et les cardiomyocytes doivent être contractiles. En général, ces propriétés sont rapportées dans les publications originales décrivant les protocoles de différenciation mais le transfert de la technologie pour le passage en phase préclinique nécessite de revoir les protocoles initiaux en intégrant des précautions particulières (Protocole GMP pour *Good Manufacture Practice*). Par exemple, nous l'avons déjà évoqué plus haut, les milieux de culture doivent être dépourvus de contaminants d'origine animale et la préparation cellulaire utilisée doit être la plus pure possible. Les deux défis majeurs sont alors de démontrer :

- **l'efficacité de la greffe** : il s'agit de mesurer la récupération fonctionnelle consécutive à l'injection des cellules d'intérêt
- **la sécurité du greffon** : elle recherche l'absence de tumeur et de réaction immunitaire.

La possibilité de trier une population cellulaire d'intérêt par une méthode très sensible et très spécifique comme le FACS permet de purifier les cellules à greffer. Cette méthode est toutefois limitée par notre connaissance des marqueurs de surface qui définissent ces populations cellulaires. Pour prendre un exemple récent, 2 équipes l'une américaine dirigée par le professeur Gordon Keller à New-York et l'autre française dirigée par le docteur Michel Puceat à Evry, ont étudié le potentiel des hES dans l'indication d'insuffisance cardiaque avancée. La première équipe a mis au point un protocole permettant de générer des progéniteurs multipotents Flk1+ à partir de cellules ES de souris et humaines capables de se différencier en cellules endothéliales, en cellules du muscle lisse vasculaire et dont environ 50% sont des cardiomyocytes contractiles (Yang, Soonpaa et al. 2008). La deuxième équipe a mis au point un protocole permettant de générer des progéniteurs cardiaques après induction des cellules hES par le BMP2 et tri sur le marqueur SEEA1+ (Leschik, Stefanovic et al. 2008; Puceat 2008). Ces cellules ont ensuite été greffées dans un modèle de singe immunodéprimé et les premiers résultats sont encourageants puisque les progéniteurs se différencient en cardiomyocytes *in vivo* et reconstituent 20% du tissu malade. De plus, la population de progéniteurs triés sur le marqueur SEEA1+ ne développe pas de tératome contrairement à la fraction SEEA1- (Blin, Nury et al., 2010).

1.3 Place des cellules iPS en thérapie cellulaire

1.3.1 Preuve de concept

Aucune étude clinique utilisant le potentiel des hiPS n'a été à ce jour débuté. En revanche, leur potentiel thérapeutique a été évalué expérimentalement avec succès chez la souris par l'équipe de Rudolf Jaenisch (Hanna, Wernig et al. 2007). Dans un modèle murin drépanocytaire (la plus courante des hémoglobinopathies d'origine génétique), des cellules fibroblastiques de peau ont été collectées et reprogrammées en cellules iPS (**Figure 30**).

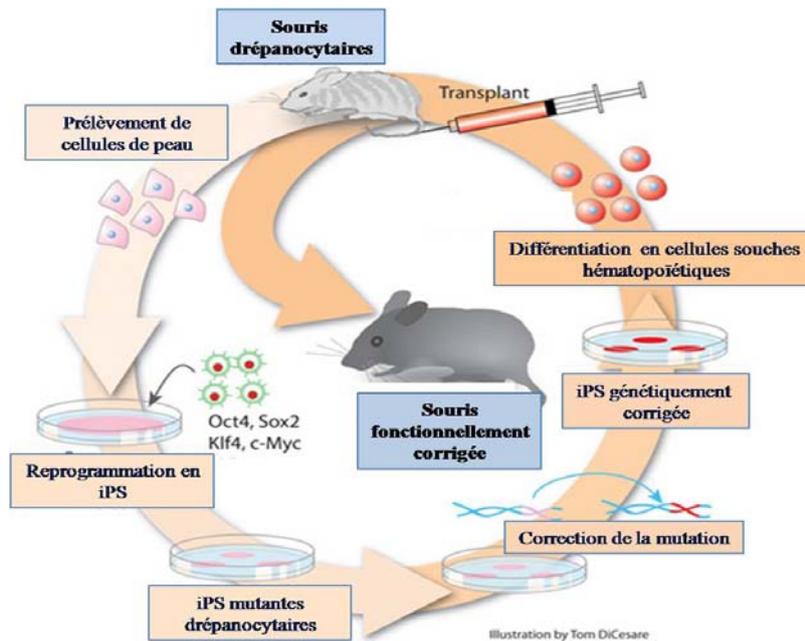


Figure 30 : Exemple de d'utilisation thérapeutique des iPS pour le traitement de souris drépanocytaires. (Modifié d'après Hanna, 2007).

Dans un premier temps, les cellules iPS mutantes ont été corrigées de leurs anomalies génétiques par manipulation génétique *ex vivo* en générant des clones allogéniques normaux. Ces cellules iPS ont ensuite été différenciées en cellules souches hématopoïétiques à partir d'EB et sélectionnées par surexpression du gène *HOXB7* impliqué dans la différenciation vers ce lignage. Enfin, ces cellules ont été greffées, comme dans une greffe de moelle classique, dans les souris malades rendues aplasiques par irradiation. Une fois la moelle reconstituée, les souris ont restauré des lignées hématopoïétiques exemptes de la maladie d'origine, permettant une récupération fonctionnelle, c'est à dire une ré-augmentation des fractions d'hémoglobine normale HbA au dépend de la forme HbS pathologique.

Cet exemple apporte la preuve de concept de l'intérêt thérapeutique des cellules iPS dans le traitement de maladies génétiques. D'une manière théorique, il est possible d'envisager ce type d'approche pour n'importe quelle maladie génétique humaine à condition, d'une part de maîtriser la différenciation des cellules iPS dans le type de cellules d'intérêt souhaité et dans des conditions de production compatibles avec une utilisation clinique, et d'autre part de pouvoir administrer ces cellules à la localisation souhaitée. Pour les maladies hématologiques, une simple transfusion est nécessaire pour que les cellules souches hématopoïétiques recolonisent la moelle osseuse par « *homing* » alors que les greffes stéréotaxiques et les

greffes chirurgicales intracardiaques permettent d'envisager ce type d'approche respectivement pour les maladies neurologiques et cardiaques.

En conclusion, les recherches appliquées dans le domaine de la thérapie cellulaire évoluent rapidement. On observe notamment dans le domaine des cellules souches adultes, une augmentation de l'utilisation du sang de cordon ombilical pour la greffe de cellules souches hématopoïétiques (création de 5 nouvelles banques en France entre 2008 et 2009). Dans le domaine des cellules souches pluripotentes, des avancées décisives ont également été réalisées. Parmi celles-ci, on peut citer : (1) la découverte des iPS (2) l'autorisation du premier essai clinique utilisant des cellules hES par la FDA (Janvier 2009). (3) la suppression des restrictions de financement fédéral aux recherches sur les cellules issues d'embryons humains par le Président américain Barak Obama (Mars 2009). (4) l'harmonisation européenne de la réglementation des médicaments de thérapie cellulaire. (5) l'implication, depuis 2008, d'une stratégie industrielle par les grands laboratoires pharmaceutiques qui commencent à ouvrir des départements de recherche et développement consacrés à la médecine régénérative (Pfizer) ou établissent des contrats de partenariat avec des laboratoires académiques (Roche, Aventis). Malgré tout cela, certains verrous scientifiques, éthiques, juridiques sont toujours à même de ralentir, voir de compromettre le développement de certaines de ces technologies (voir la partie discussion).

2. Applications dans l'industrie pharmaceutique

Le marché des produits de la santé est l'un des plus importants à travers le monde. Dans un contexte très concurrentiel, le processus de recherche conduisant à la mise sur le marché d'un médicament est lent, extrêmement coûteux (de l'ordre de 900 millions de dollars sur 10 à 15 ans) et subit un taux d'échec très important (Kola and Landis 2004). L'une des raisons principales de ces problèmes vient du fait que les modèles utilisés, aussi bien dans les phases de découverte de nouveaux composés potentiellement thérapeutiques que dans les phases d'évaluation de leurs propriétés pharmacologiques ou toxicologiques, sont parfois peu représentatifs du malade et conduisent à des erreurs souvent révélées tardivement.

Actuellement, l'industrie pharmaceutique réfléchit à de nouveaux modèles plus pertinents pour mener efficacement leur recherche. Les cellules souches pluripotentes font partie de ces

options et pourraient faire partie des stratégies utilisables tout au long du cycle de développement d'un médicament.

2.1 De l'hypothèse scientifique à la cible moléculaire, la modélisation pathologique

Afin de modéliser une maladie humaine dans le but de l'étudier et de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués, les scientifiques ont recouru à des modèles qui sont censés être le plus représentatifs de la pathologie étudiée dans lesquels ils peuvent tester leurs hypothèses et rechercher une cible moléculaire altérée (ex. modèles animaux, coupe organotypique, modèles cellulaires). Par exemple, les cellules de patients affectées par la dite maladie constituent un modèle pertinent. Malheureusement, cette ressource biologique est trop souvent rare du fait même de la maladie (maladie génétique) ou à cause de la difficulté d'accès à une ressource particulière par exemple une biopsie nécessitant une opération chirurgicale parfois risquée pour le patient (foie, cerveau, rein...). De plus, les expérimentations sur ces prélèvements peuvent être limitées par leur hétérogénéité (les biopsies sont des mélanges cellulaires), par le statut post-mitotique de certaines cellules (neurones) que l'on n'obtient en très faible quantité et que l'on ne peut pas amplifier ni conserver ou encore par la perte de leur phénotype en culture (hépatocyte). Pour pallier le problème de la quantité cellulaire, des lignées cellulaires cancéreuses ou rendues immortalisées par manipulation génétique sont utilisées. Ces cellules, bien qu'utiles, sont des modèles assez éloignés de la maladie, d'autant que leurs voies de signalisation et leurs métabolismes sont eux-mêmes perturbés. Ainsi, les résultats biologiques générés sur ces modèles peuvent conduire à des conclusions erronées sur les mécanismes physiopathologiques. Les cellules souches pluripotentes (hES et plus récemment les hiPS) peuvent apparaître comme des modèles cellulaires de nouvelles générations, en particulier dans la modélisation des maladies monogéniques entraînant des anomalies du développement (Cezar, 2007; Cezar, 2007; McNeish, 2004). Elles offrent la possibilité de palier à un certain nombre de problèmes du fait de leurs caractéristiques. Théoriquement, les propriétés d'auto-renouvellement des cellules souches pluripotentes (hES/hiPS) permettent de s'affranchir de la limitation en matériel biologique, puisqu'une fois établies ces cellules offrent la possibilité de disposer d'une source continue de cellules. De plus, leur propriété de pluripotence permet l'obtention de cellules de phénotypes pertinents, parfois inaccessibles par un autre moyen, à condition cependant de pouvoir disposer de protocoles de différenciation guidée, adaptés

(Dvash, Ben-Yosef et al. 2006; Ben-Yosef, Malcov et al. 2008; Stephenson, Mason et al. 2009).

2.1.1 Modélisation pathologique des maladies génétiques

La modélisation pathologique permet d'étudier les mécanismes physiopathologiques et de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques pour une maladie donnée. L'existence de lignées hES mutantes spontanées ou artificielles permet d'envisager la modélisation pathologique de nombreuses maladies monogéniques. Elles peuvent être obtenues de plusieurs façons : (1) par modifications génétiques : une mutation est introduite dans des cellules ES dérivées d'un embryon surnuméraire normal. (2) par dérivation à partir d'un embryon porteur d'une mutation identifiée dans le cadre d'un diagnostic préimplantatoire (DPI). (3) par reprogrammation directe à partir de tissus de patients (iPS spécifiques de patients).

2.1.1.1 *Les cellules hES normales modifiées par génie génétique*

Le transfert de gènes dans les cellules ES permet de produire des souris transgéniques afin de tester leurs fonctions à l'échelle d'un animal entier. Pour des raisons évidentes, cette technique est impossible à transférer à l'Homme, en revanche il est possible, comme pour toute lignée, de modifier les cellules hES par génie génétique (Eiges, Schuldiner et al. 2001; Pfeifer, Ikawa et al. 2002; Ma, Ramezani et al. 2003; Zwaka and Thomson 2003). Ces manipulations sont considérées d'un point de vue légal comme un organisme génétiquement modifié dont les exigences diffèrent principalement en fonction des moyens mis en œuvre pour le transfert de gènes et surtout du type de transgène mais finalement peu du type de cellules modifiées. L'une des applications immédiates de ces manipulations génétiques est la possibilité de créer, à partir des cellules hES normales, des lignées porteuses d'une maladie génétique (Friedrich Ben-Nun and Benvenisty 2006). Les modèles de maladies génétiques dominantes dues à une mutation de type gain de fonction peuvent être créés simplement en introduisant dans les cellules ES le gène malade alors que pour les maladies récessives dues à une mutation de type perte de fonction, il faut cibler les 2 allèles d'un gène. Cela peut être réalisé soit en insérant une mutation dirigée par recombinaison homologue ou par la technique du piégeage de gènes, soit en éteignant l'expression d'un gène cible par ARN interférence. (Tenzen, Zembowicz et al. 2010)

Plusieurs modèles cellulaires ont ainsi été créés par cette technique. Par exemple dans le syndrome de Lesch Nyhan, des cellules hES normales ont été modifiées en introduisant une mutation dans le gène causal de la maladie, le gène *HPRT1* (Zwaka and Thomson 2003; Urbach and Benvenisty 2009).

2.1.1.2 Les lignées de cellules ES mutantes porteuses d'anomalies génétiques

Ces lignées de cellules souches sont dérivées dans le cadre d'une procédure médicalement assistée associant fécondation *in vitro* (FIV) et diagnostic préimplantatoire (DPI). Cette technique permet à un couple ayant un risque important (25-50%) de transmettre une maladie génétique grave et incurable de pouvoir donner naissance à un enfant exempt de la maladie. La procédure générale est celle de la FIV avec un DPI réalisé au stade morula (8 cellules). Un blastomère est prélevé et analysé par une méthode de biologie moléculaire afin de détecter les embryons porteurs de la maladie recherchée. Les embryons qui ne sont pas réimplantés peuvent être utilisés dans un but de recherche et notamment pour la dérivation de lignée de cellules hES mutantes (**Figure 31**).

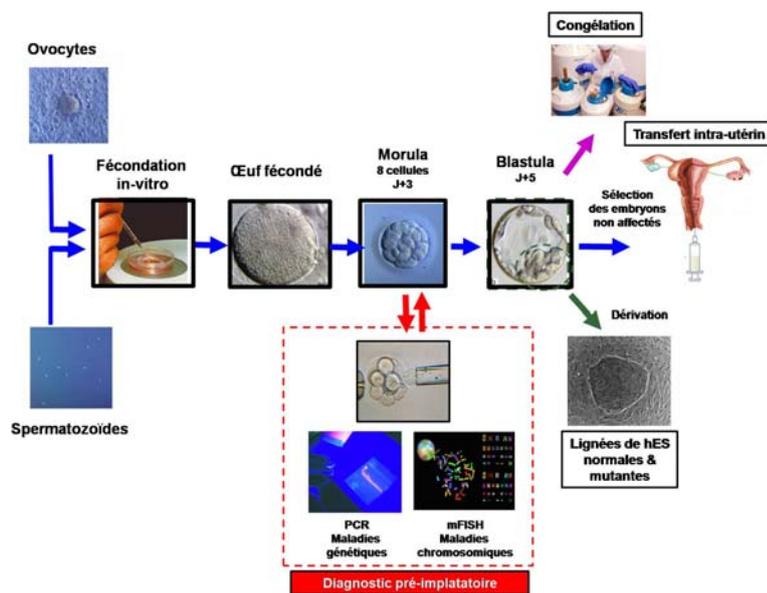


Figure 31 : Origine des lignées de cellules souches embryonnaires mutantes.

Au cours de la fécondation *in-vitro* (flèche bleue), les ovocytes et les spermatozoïdes sont mis en contact dans une boîte de pétri en présence de milieu de culture adapté. L'embryon évolue jusqu'au stade blastocyste (5^{ème} jour). Les embryons choisis sont transférés par insémination artificielle dans l'utérus receveur et la grossesse peut alors se poursuivre. Les embryons surnuméraires sont soit congelés (flèche violette), soit détruits et dans ce dernier cas ils peuvent servir à établir une lignée de cellules hES (flèche verte) après recueil du consentement éclairé du couple. Lors du diagnostic préimplantatoire (flèche

rouge), un blastomère peut être biopsié au stade 8 cellules et analysé par des méthodes de PCR ou de mFISH afin de détecter la présence respectivement d'une maladie génétique ou chromosomique, c'est ce que l'on appelle le diagnostic pré-implantatoire. Les embryons avec 7 blastomères se développent normalement jusqu'au stade blastocyste et les embryons exempts de la maladie sont inséminés permettant la naissance d'enfant non atteint.

Certaines de ces pathologies « graves et incurables » sont plus fréquemment testées que d'autres du fait notamment de l'existence de moyen diagnostic en terme de rapidité, fiabilité et de la compatibilité de ces techniques de biologie moléculaire avec l'utilisation d'une seule cellule pour le test.

Cette technologie a permis d'obtenir des lignées de cellules souches hES mutantes principalement pour les maladies couramment testées dans le cadre du DPI, telles que la mucoviscidose, la myopathie de Duchenne, le syndrome de l'X fragile, la chorée de Huntington et la Dystrophie Myotonique de type I. (Frumkin, Malcov et al.; Pickering, Minger et al. 2005; Verlinsky, Strelchenko et al. 2005; Mateizel, De Temmerman et al. 2006).

Au cours de ma thèse réalisée à l'institut I-Stem sous la direction du Docteur Geneviève Piétu, j'ai pu participer à une étude publiée cette année dans la revue *Cell Stem Cell* qui apporte des arguments en faveur de l'intérêt de ces cellules comme outil cellulaire permettant de révéler des anomalies inconnues pour une maladie donnée (Marteyn, Maury et al., 2011).

Dans ce travail nous avons utilisé des lignées de cellules souches embryonnaires humaines porteuses de la mutation causale de la dystrophie myotonique (DM1) pour identifier et comprendre les mécanismes associés à cette maladie génétique. Celle-ci est caractérisé au niveau moléculaire par la présence d'ARNm mutant du gène de la DMPK contenant des répétitions (CUG)_n responsables d'inclusions ribonucléoprotéiques (focis) qui sont retenues dans le noyaux des cellules affectées. Cette maladie a un tableau clinique multisystémique incluant une myotonie (lenteur à la décontraction musculaire).

Grâce à la capacité des cellules hES à se spécialiser en neurones moteurs, les neurones qui contrôlent les muscles à partir de la moelle épinière, nous avons pu étudier l'effet de la mutation sur la formation de ces connexions neuromusculaires. Des analyses comparatives entre les cellules provenant d'embryons affectés et celles provenant d'embryons sains ont permis d'associer à la maladie une pousse exubérante de prolongements neuronaux, paradoxalement associée à une réduction drastique du nombre de contacts synaptiques et donc de la transmission de l'information vers les muscles (**Figure 32**).

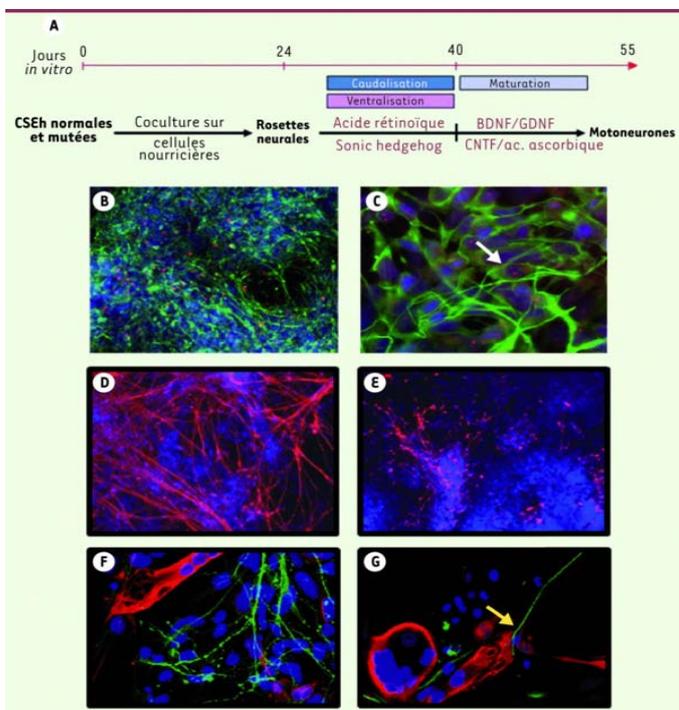


Figure 32.
Anomalies phénotypiques des motoneurones issus des cellules hES DM1. (=CSEh)

On observe une augmentation anormale de l'arborisation neuritique entraînant des défauts dans la capacité des motoneurones à interagir avec leur cible musculaire. A. Représentation schématique du protocole de différenciation des hES en motoneurones. La première étape de ce protocole se base sur une coculture entre les hES et des cellules stromales permettant l'induction neurale. Les précurseurs neurales ainsi obtenus, sous la forme de rosettes neurales, sont traités par de l'acide rétinoïque ou Sonic hedgehog, deux facteurs connus pour leur rôle dans la différenciation cholinergique. La maturation terminale des motoneurones est ensuite induite, pendant 1 à 2 semaines, en maintenant les

cellules en présence de facteurs de survie tels que le BDNF (brain-derived neurotrophic factor), le GDNF (growth-derived neurotrophic factor) et l'acide ascorbique. B. Une proportion (30 %) des neurones (détectés par immunomarquage pour TuJI) exprime le marqueur nucléaire spécifique des motoneurons Hb9 (en rouge). C. Détection par hybridation in situ des inclusions ribonucléoprotéiques (en rouge) au niveau des neurones détectés par immunomarquage pour le marqueur TuJI (en vert). Un exemple est illustré par la flèche blanche. D. La détection du marqueur pan neuronal MAP2 (en rouge) permet de révéler l'augmentation de l'arborisation neuritique dans les cultures neuronales issues des cellules hES DM1 par rapport aux hES contrôles (E). F. Les neurites des motoneurons DM1 (en vert, marqueur TuJI) se connectent moins bien aux cellules musculaires (en rouge, marqueur desmine) que des motoneurons contrôles (G). La flèche jaune illustre un exemple d'interaction neurone-cellule musculaire.

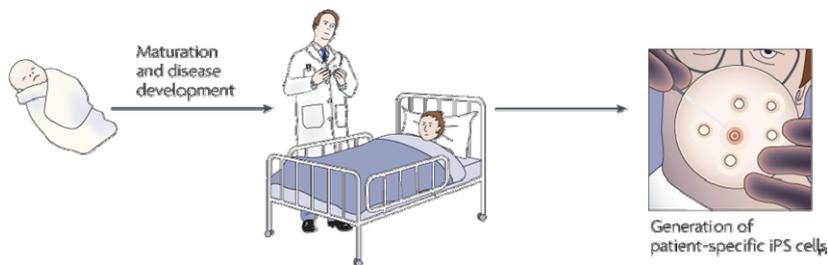
De plus, au niveau moléculaire, nous avons pu identifier deux gènes de la même famille, SLITRK 2 et 4, dont l'expression est faible dans les cellules porteuses de la maladie. Par ailleurs, nous avons montré que la correction de ces défauts moléculaires jusqu'alors inconnus mais, depuis, confirmés chez les patients, a permis de normaliser l'exacerbation du réseau neuritique observée dans les cellules mutantes, démontrant ainsi le lien direct entre ces deux phénomènes. Aujourd'hui, ces travaux ouvrent un champ d'exploration considérable. Des dizaines de lignées cellulaires issues d'embryons porteurs d'autres maladies génétiques diverses, sont disponibles dans les banques de cellules des laboratoires. Parmi ces maladies, les équipes d'I-Stem sont déjà lancées, par exemple, sur la maladie de Huntington ou la neurofibromatose de type 1... Ces multiples lignées sont autant de programmes de modélisation pathologique à venir. Au-delà, les équipes d'I-Stem ont déjà entrepris d'utiliser les cellules porteuses de la dystrophie myotonique de Steinert qu'elles ont caractérisées pour chercher des médicaments susceptibles de corriger les anomalies en laboratoire, premier pas vers la découverte éventuelle de traitements applicables chez les patients (voir le paragraphe 2.2, de la cible à la molécule).

2.1.1.3 Les cellules souches induites à la pluripotence spécifique de patients

La possibilité d'induire expérimentalement la pluripotence par reprogrammation directe de fibroblastes ou de lymphocytes de patients, cellules facilement accessibles, permet d'étendre de manière considérable la possibilité de créer des modèles cellulaires de maladies génétiques humaines. Chaque clone d'iPS généré à partir des cellules d'un patient spécifique permet d'envisager l'obtention de plusieurs sous modèles cellulaires donnant ainsi la possibilité de tenir compte de l'âge, du sexe mais aussi et surtout du type de mutation.

Très rapidement, plusieurs équipes, dont celles de Georges Q. Daley à l'hôpital pédiatrique de Boston, ont dérivé des clones d'iPS en reprogrammant principalement des fibroblastes de

patients en utilisant la méthode lentivirale avec les 4 facteurs (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMYC*) (Park, Arora et al. 2008). Ce premier papier fait état de l'établissement d'une première banque de lignées iPS obtenue pour une dizaine de maladies génétiques (**Tableau 6**).



Park, et al. *Cell* (2008).

Table 1. iPS Cells Derived from Somatic Cells of Patients with Genetic Disease

Name	Disease	Molecular Defect
ADA	ADA-SCID	GGG > AGG, exon 7 and Del(GAAGA) exon 10, <i>ADA</i> gene
GD	Gaucher disease type III	AAC > AGC, exon 9, G-insertion, nucleotide 84 of cDNA, <i>GBA</i> gene
DMD	Duchenne muscular dystrophy	Deletion of exon 45–52, <i>dystrophin</i> gene
BMD	Becker muscular dystrophy	Unidentified mutation in <i>dystrophin</i>
DS1, DS2	Down syndrome	Trisomy 21
PD	Parkinson disease	Multifactorial
JDM	Juvenile diabetes mellitus	Multifactorial
SBDS	Swachman-Bodian-Diamond syndrome	IV2 + 2T > C and IV3 – 1G > A, <i>SBDS</i> gene
HD	Huntington disease	72 CAG repeats, <i>huntingtin</i> gene
LNSc	Lesch-Nyhan syndrome (carrier)	Heterozygosity of <i>HPRT1</i>

Tableau 6 : Génération des iPS et exemples de maladies pour lesquelles il existe un modèle iPS spécifique de patients.

(D'après Park, 2008).

Trois autres études rapportent la description de cellules iPS spécifiques de patients. Les 2 premières concernent des iPS de maladies de l'adulte affectant le motoneurone, la sclérose latérale amyotrophique (Dimos, Rodolfa et al. 2008) et l'atrophie musculaire spinale (Ebert, Yu et al. 2009). Dans la première étude, aucune différence n'est observée entre les lignées normales et mutées alors que la seconde révèle la dérégulation du gène impliqué dans la maladie (*SMN*, codant un facteur de survie du motoneurone). Dans cette même étude, les auteurs montrent également que l'acide valproïque et la trobramycine, deux molécules connues pour stimuler l'expression du gène *SNM*, permettaient de rétablir des niveaux d'expression normale. La dernière étude récemment publiée par le groupe de Lorentz Studer porte sur la dérivation d'iPS pour une maladie congénitale affectant les cellules des crêtes neurales, la dysautonomie familiale (Lee, Papapetrou et al. 2009). Ces travaux sont les premiers à rapporter réellement un phénotype. Les iPS mutantes ont été différenciées en cellules des crêtes neurales puis en neurones sympathiques. Les auteurs ont pu montrer que cette différenciation terminale était altérée reproduisant le phénotype observé chez les patients. De plus, la réalisation d'un crible de composés chimique a permis d'identifier de

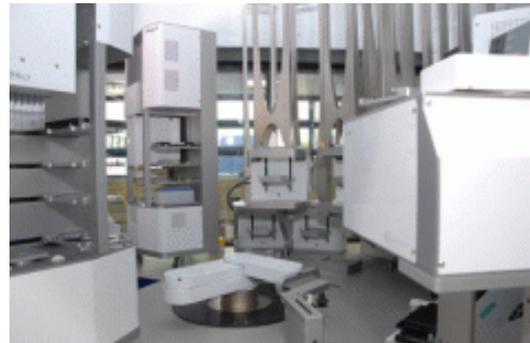
nouvelles molécules potentiellement thérapeutiques démontrant pour la première fois l'intérêt de ces cellules pour une modélisation pathologique. Depuis de nombreux autres modèles pathologiques de maladies monogéniques utilisant les cellules iPS ont été publiés récemment (Maury, Gauthier et al. 2011).

2.2 De la cible moléculaire à la molécule « hit », le criblage à haut débit.

Les cellules souches pluripotentes offrent l'avantage de permettre d'obtenir des quantités importantes de cellules affectées par la maladie. Il est ensuite possible de les différencier vers des populations homogènes de progéniteurs intermédiaires (progéniteurs du mésoderme ou cellules souches neurales) qui représentent des ressources biologiques adaptées pour le criblage à haut débit. Au cours de cette étape des dizaines de milliers de molécules vont être mises en contact avec le modèle cellulaire muté et un test spécifique sera développé pour mettre en évidence les molécules (les « hits » ou « touches ») qui permettront de normaliser la modulation pathologique d'une cible identifiée au cours de l'étape de modélisation pathologique.

Figure 33 : Photo de l'intérieur du robot BioCell

Ce robot est utilisé au laboratoire I-Stem (et dans d'autres laboratoires de l'industrie pharmaceutique) pour le criblage de chimiothèques. On distingue le bras automatisé et des plaques de culture de 384 puits. (I-Stem ©)



Ces cibles moléculaires peuvent être l'un des stigmates pathognomoniques de la maladie pour la dystrophie myotonique de type 1, la présence de foci nucléaires. Dans ce cas, toutes molécules capables de faire disparaître ces foci pourraient être considérées comme potentiellement thérapeutiques. Il peut s'agir aussi de trouver des molécules capables de restaurer un phénotype normal. Toujours dans l'exemple précédent, toutes molécules capables de diminuer la pousse neuritique des motoneurones malades ou encore toutes molécules capables de soutenir l'expression du marqueur identifié SLITRK4 pourrait être considérées comme thérapeutiques. Cette phase de recherche des médicaments est « incontournable » dans l'industrie pharmaceutique et demande des ressources technologiques importantes adaptées au pré-requis du « haut débit » (Figure 33). Ainsi, les cellules souches pluripotentes et leurs dérivés semblent adaptés aux exigences industrielles.

2.3 De la molécule « hit » au médicament, étude préclinique et clinique

Une fois identifiée, la molécule « hits » passe par une étape de validation interne (re-test, contre-test, IC50, cytotoxicité). Au cours de cette étape, la molécule peut subir des « ajustements » chimiques. La molécule optimisée devient un « lead » et rentre en phase « préclinique ». Cette phase est très importante puisque celle-ci a pour but d'apporter un niveau de sécurité et d'efficacité suffisant avant le passage chez l'Homme (étude clinique). Cette phase utilise des modèles animaux, cellulaires et *in-silico* afin de déterminer les paramètres pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et toxicologiques de la molécule. Ces modèles doivent également être choisis avec précaution et mimer autant que possible la réalité. Au cours de cette phase, de nombreux tests utilisent des animaux. Dans le contexte législatif actuel, les différentes réglementations européennes et les recommandations de l'OCDE incitent les industriels à limiter l'utilisation des animaux pour leurs études. L'utilisation des cellules souches pluripotentes se présente également dans ce cadre comme des modèles innovants notamment en toxicologie prédictive. Les cellules souches pluripotentes sont notamment précieuses car elles peuvent se différencier en deux phénotypes particulièrement intéressants pour ces études : les hépatocytes et les cardiomyocytes. En effet, la majorité des effets toxiques et des effets indésirables constatés aux cours du développement clinique ou après la mise sur le marché d'une molécule concerne l'hépatotoxicité et la cardiotoxicité. Ces deux événements conduisent soit à l'arrêt du développement de la molécule soit à son retrait du marché (**Figure 34**).

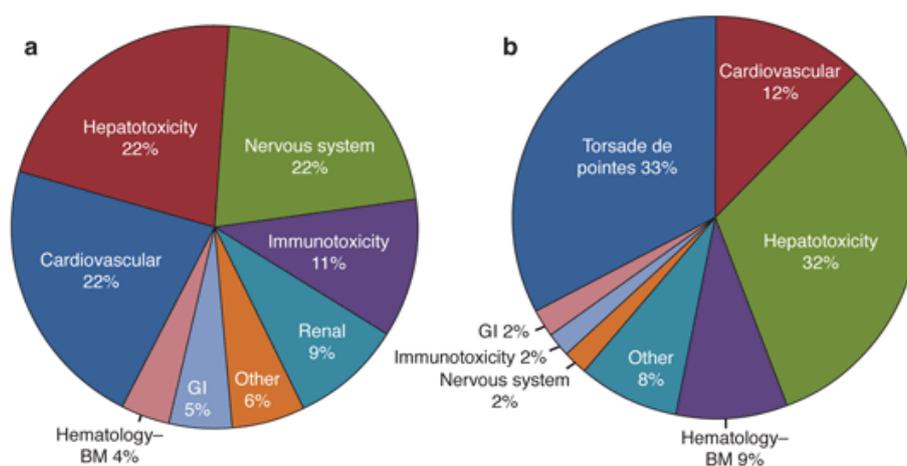


Figure 34: Effets indésirables causant (a) l'arrêt du développement clinique des composés en phase I-III (b) le retrait du marché. Les pourcentages sont calculés sur 79 médicaments en phases clinique et 47 qui avaient une autorisation de mise sur le marché (AMM). BM moelle osseuse ; GI Gastro -intestinale (Watkins, 2011).

2.3.1 Modèles cellulaires utilisant des hépatocytes dérivés de cellules pluripotentes

Les hépatocytes ont un rôle central dans les mécanismes de transport et de clairance de toutes sortes de molécules exogènes, en particulier les médicaments. Toutes les molécules absorbées par voie orale se retrouvent dans le système sanguin au niveau de la veine porte hépatique. Certains d'entre-eux sont métabolisés de manière extrêmement efficace de sorte que la quasi-totalité de la molécule est éliminée avant même sa distribution au tissu cible par la circulation systémique (on appelle ce phénomène, l'effet de premier passage hépatique). De plus, au moment de leur métabolisation, les molécules peuvent être transformées par un équipement enzymatique hépatocytaire en métabolites pouvant être toxiques. L'utilisation de modèles d'hépatocytes est donc indispensable dans les phases précliniques à la fois pour déterminer les paramètres pharmacocinétiques de la molécule mais aussi son effet hépatotoxique éventuel. Comme nous l'avons dit précédemment, les cellules primaires et les cellules transformées (type HepG2, HepaRG...) ne sont pas satisfaisantes et ne permettent pas de prévoir ces paramètres de manière optimale. Les cellules souches pluripotentes pourraient représenter une nouvelle source d'hépatocytes à condition de pouvoir les guider dans leur différenciation de manière adéquate. Plusieurs publications ont montré qu'il était possible d'obtenir des cellules ressemblant à des hépatocytes en suivant un protocole qui récapitule l'ontogénèse embryonnaire (**Figure 35**).

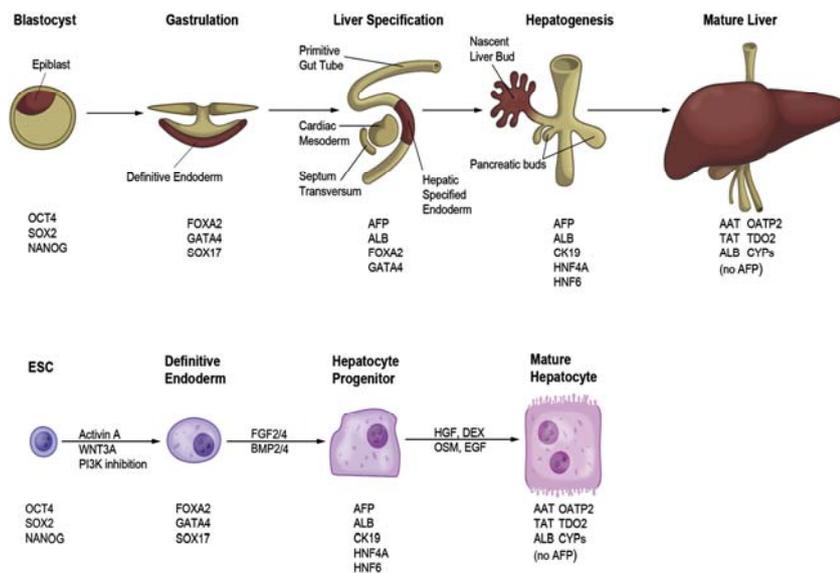


Figure 35: Schéma représentant la différenciation hépatique in vitro et in vivo. Des marqueurs phénotypiques de chacune des étapes sont présentés ainsi qu'un certain nombre de molécules utilisées dans les différents protocoles. (D'après Baxter, Rowe et al., 2011).

Le protocole en 3 phases consiste à orienter les cellules vers l'endoderme définitif. On peut obtenir près de 80% de cellules correctement différenciées (D'Amour, Bang et al. 2006). Les progéniteurs endodermiques sont ensuite spécifiés vers le stade hépatoblaste puis ces derniers sont induits vers la différenciation hépatique terminale. Les cellules obtenues présentent une morphologie polygonale typique et expriment de nombreux marqueurs hépatiques. Elles montrent également une certaine fonctionnalité *in vitro* comme la synthèse et la sécrétion d'albumine, la synthèse d'urée, le stockage du glycogène et une activité de transport. Ces cellules expriment aussi des enzymes du métabolisme de type I comme le cytochrome P450 CYP1A (Duan, Catana et al. 2007) mais aussi le CYP3A4 qui est responsable de la métabolisation de plus de 50% des médicaments. (Hay, Zhao et al. 2008) ou encore le CYP2C9 qui métabolise le tolbutamide alors que cette drogue n'est pas métabolisée dans les modèles hépatiques classiques, de type HepG2. Parmi, les enzymes de type II, les cellules obtenues expriment la glutathione-S tranférase (GST) à des niveaux équivalents à ceux des hépatocytes primaires (Soderdahl, Kuppers-Munther et al. 2007). De plus, cette GST est fonctionnelle et répond à des molécules inductrices connues.

Ces résultats sont relativement encourageants même si les cellules terminales complètement différenciées sont encore difficiles à obtenir. Il est possible que des systèmes de culture en 3-D et/ou des co-cultures avec des cellules de Küpffer ou des cellules endothéliales permettent de recréer des conditions environnementales qui miment le contexte hépatique *in-vivo* permettant ainsi de créer des modèles cellulaires performants.

2.3.2 Modèles cellulaires utilisant des cardiomyocytes dérivés de cellules pluripotentes

La cardiotoxicité est un point clé du développement d'un médicament car sa recherche est demandée par les agences réglementaires américaine (FDA) et européenne du médicament (EMA). Par exemple, la capacité de certaines molécules à induire de manière inattendue des torsades de pointe par prolongement de l'espace QT est la première cause de retrait de produit du marché.

La possibilité de différencier les cellules hES vers des cardiomyocytes fonctionnels, c'est-à-dire répondant aux stimuli électriques et pharmacologiques, suggère la présence de canaux et de récepteurs adrénergiques et muscariniques adéquats (Norstrom, Akesson et al. 2006). Par ailleurs, la possibilité d'enregistrer des courants électriques sur ces cardiomyocytes

dérivés de hES, par exemple par le système de puce à microélectrodes, permet de prédire la capacité d'une molécule à retarder la repolarisation (Liang, Matzkies et al.; Reppel, Pillekamp et al. 2005). Ce modèle permet également de tester de nombreux autres paramètres parmi lesquels la fonction contractile, l'arythmie cardiaque et la réponse au stress oxydant.

2.3.3 Détermination de la tératogénicité

La tératogénicité est l'un des critères évalué pendant les phases précliniques. Elle est définie comme un effet toxique due à un xénobiotique (polluants, contaminants, médicaments) capable d'entraîner des anomalies du développement embryonnaire. En effet, l'embryon humain peut être extrêmement sensible aux effets de molécules qui traversent la barrière placentaire. Par conséquent, la détermination du risque toxique est un élément clé de la sécurité d'utilisation d'un médicament. Toutefois, peu de tests (y compris les tests animaux) sont suffisamment prédictifs. Les cellules souches pluripotentes pourraient être des alternatives intéressantes pour prévoir l'effet tératogène d'un composé. Depuis près de 10 ans, l'une de ces méthodes validée par l'ECVAM (le centre européen de validation des méthodes alternatives) est déjà proposée aux industriels. Il s'agit du « test des cellules souches de souris »(Genschow, Spielmann et al. 2002). Dans ce test, les cellules ES de souris sont différenciées en corps embryonnaire battant (=présence de cellules ressemblant à des cardiomyocytes responsables de zones de contraction spontanées). Ce test consiste à identifier sur les bases d'un ensemble de marqueurs, les molécules capables d'altérer la différenciation. Ce test donne de bon résultat et permet prévoir de manière précise les molécules aux propriétés tératogènes (Genschow, Spielmann et al. 2004). Ce test est toujours en cours de développement dans le cadre du projet ReProTect et d'autres tests utilisant des cellules ES humaines sont également en développement. Ces derniers permettraient de limiter les extrapolations inter-espèces entre l'Homme et la souris qui furent responsables par le passé de scandales (exemple du distilbène).

2.4 Du médicament pour tous au médicament personnalisé

Comme nous l'avons vu, un médicament peut être retiré du marché à cause d'effets indésirables révélés lors de son utilisation à grande échelle dans la population mondiale. En général, il est extrêmement difficile de prévoir ces effets qui peuvent ne concerner qu'une

petite proportion de la population générale, qui peut réagir de manière différente à une molécule du fait de différences interindividuelles.

Les cellules iPS spécifiques de patients permettent de tenir compte de la diversité génétique interindividuelle et en font des modèles innovants pour la médecine personnalisée. Avec ces modèles, il est théoriquement possible d'étudier les effets des polymorphismes et du contexte pathologique (présence de mutation) sur les paramètres pharmacocinétiques d'une molécule dans un phénotype cellulaire particulier. A terme, ces modèles devraient permettre d'anticiper les effets indésirables d'une molécule chez un patient donné (ou plus justement un groupe de patients) permettant ainsi d'anticiper les effets indésirables (**Figure 36**).

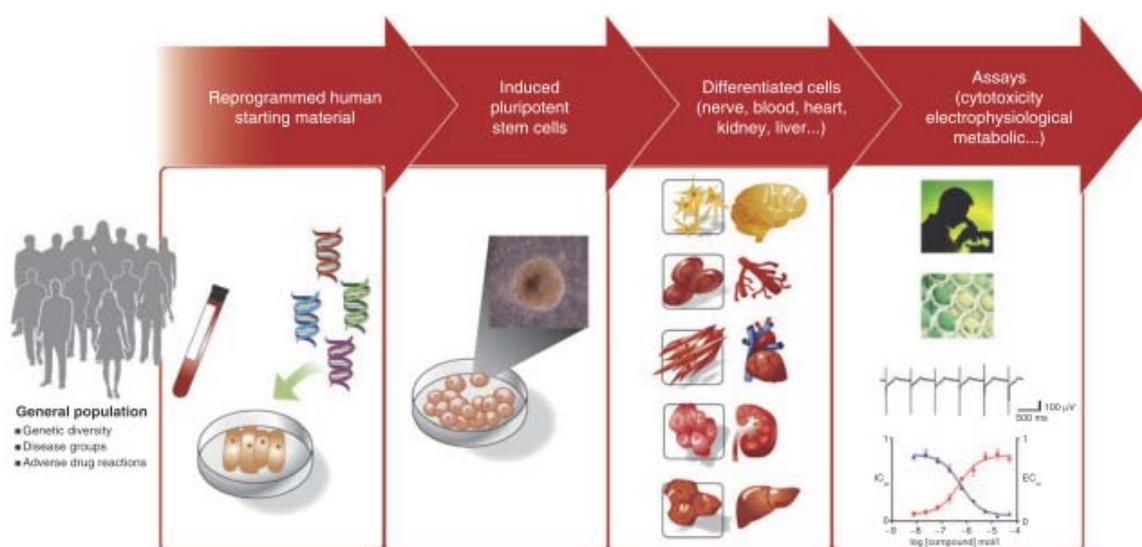


Figure 36 : génération et utilisation des cellules souches pluripotentes en toxicologie prédictive. Les cellules somatiques de la peau, du sang, du tissu graisseux ou d'autres tissus peuvent être utilisées après consentement des donneurs pour la génération de cellules iPS spécifiques de patients (*Adapté de Anson, Kolaja et al., 2011*)

3. Applications en recherche fondamentale

3.1 Compréhension des mécanismes de différenciation

La compréhension des mécanismes responsables du développement cellulaire et tissulaire est certainement l'un des défis les plus importants que les biologistes cellulaires ont à relever, tant les mécanismes moléculaires qui permettent la différenciation de cellules souches ou de progéniteurs vers un type de cellules spécialisées est complexe. De plus, l'étude des étapes précoces du développement humain est compliquée par l'accès à des ressources biologiques

qui se limite, lorsque ces recherches sont autorisée, à des études anatomiques et biochimiques réalisées par dissection d'embryons malades après avortement.

Cependant, la quantité d'informations accumulées en biologie du développement a été possible grâce à l'utilisation d'animaux modèles (xénope, drosophile, zébrafish, *Caenorhabditis elegans*), en particulier la souris dont les caractéristiques génétiques sont bien définies. Bien que ces études aient fait indiscutablement progresser notre connaissance de la biologie du développement, il existe des différences majeures en termes de taille, de croissance et d'anatomie entre la souris et l'Homme entraînant des différences dans l'expression de certains gènes et dans le métabolisme. En complément de l'usage des modèles animaux, l'utilisation de lignées cellulaires humaines et en particulier les cellules hES, apparaît comme un outil performant pour l'étude des processus physiopathologiques impliqués dans les mécanismes développementaux (Dvash, Ben-Yosef et al. 2006).

Il existe actuellement des données de la littérature montrant que la différenciation des cellules ES de souris et humaines sont capables de récapituler les étapes du développement précoce embryonnaire. Par exemple, l'expression des gènes connus pour être exprimés *in vivo* soit de manière très précoce, soit plus tardivement au cours de la différenciation spécifique de lignage, est reproduit dans l'espace et dans le temps lors de la formation d'EB à la fois chez la souris (Leahy, 1999) et chez l'Homme (Dvash, Mayshar et al. 2004). Dans cette dernière étude, les chercheurs ont étudié la voie de signalisation médiée par Nodal qui joue un rôle dans la détermination des axes embryonnaires (gauche/droite, antéro/postérieur et dorso/ventral) et dans l'induction du mésoderme au cours de la gastrulation. Ils ont comparé le niveau d'expression de *NODAL* et de ces cibles *LEFTYA*, *LEFTYB* et *PITX2* entre les stades EB précoces, intermédiaires et matures. Ces gènes sont activés au cours de la différenciation en reproduisant le profil d'expression qui se produit naturellement *in vivo* au cours du développement embryonnaire normal.

La conservation de la chronobiologie au cours de la différenciation des ES de souris peut également être illustrée par une étude relativement ancienne dans laquelle l'expression des gènes de l' α et de la β globine a été suivie au cours de la différenciation en EB. Ce processus est régulé tout au long du développement et la séquence chronologique d'expression est parfaitement mimée par le modèle cellulaire ES de souris (Lindenbaum and Grosveld 1990) (**Figure 37**).

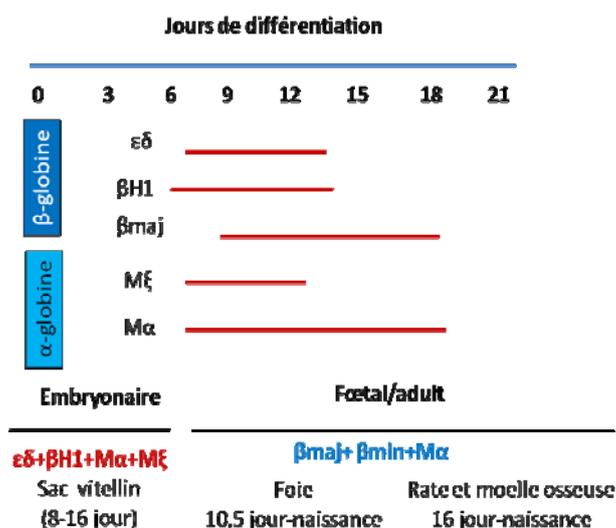


Figure 37 : Expression des gènes de l'α- et de la β- globine au cours de la différenciation des cellules mES. Ces gènes sont exprimés à des stades spécifiques du développement dans des sites différents d'érythropoïèse. Les EB dérivés des ES expriment les différentes isoformes d'hémoglobine qui apparaissent dans un ordre chronologique identique à leur apparition *in vivo*.

De manière plus générale, l'étude des profils d'expression génique par transcriptome sur puces à ADN a largement contribué à l'identification de groupes de gènes impliqués dans la différenciation des cellules hES au cours de la formation des EB ou au cours de différenciation spécifique de lignage.

3.2 Etude du processus tumorigène

Il existe deux hypothèses pour expliquer la progression tumorale. La première hypothèse est dite stochastique, qui propose que toutes les cellules dans une tumeur aient la capacité de former et de maintenir une masse tumorale. La seconde hypothèse est dite hiérarchique. Elle suggère l'existence d'un groupe de cellules avec un phénotype souches (les cellules souches cancéreuses, CSC) qui, comme dans les tissus normaux, entretiennent un pool de cellules tumorales grâce à une production en continu de ces cellules elles-mêmes et de leurs progénies (Reya, Morrison et al. 2001).

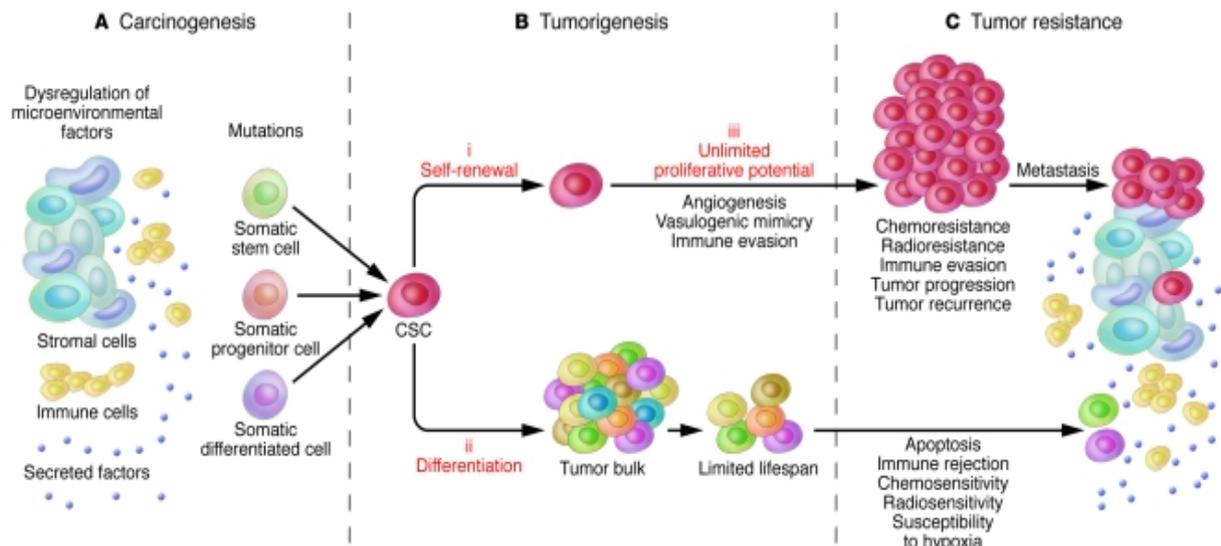


Figure 38 : Notion de Cellules souches cancéreuses. (A) Carcinogénèse. Des tumeurs peuvent se développer suite à la mutation de gènes. Une dérégulation du microenvironnement pourrait également contribuer au processus de carcinogénèse. Ces événements pourraient affecter des cellules somatiques qui deviendraient alors des cellules cancéreuses initiales (CSCs). (B) Tumorigénèse. Les CSCs contribueraient à la tumorigénicité par (i) leur capacité d’auto-renouvellement illimitée, (ii) par la génération, du fait de leur potentiel de différenciation, de cellules tumorales qui ne présentent plus la propriété « souche » et (iii) par une contribution, dans certains cas, à l’angiogenèse et à la dissémination. (C) Résistance. Les CSCs présenteraient une résistance aux traitements par chimio/radiothérapie. Ces thérapies interféreraient donc peu ou pas avec la capacité des CSCs à initier la progression tumorale, les métastases ainsi que les récives. (D’après Frank *et al.*, 2010).

Pour autant, on ne sait pas, parmi les CSC et les progéniteurs partiellement engagés qui en dérivent ou quels types cellulaires sont à l’origine de l’initiation de la tumeur (cellules initiatrices de tumeur). Chez l’Homme, des CSC ont été identifiées dans de nombreux cancers (ex : leucémie, mélanome, carcinome colique, cancer de la vessie, du poumon, du système nerveux central, des ovaires, du foie, du pancréas...) sans qu’il soit possible d’affirmer à l’heure actuelle qu’elles soient présentes dans toutes les tumeurs malignes. Il est intéressant de constater que, dans certains cancers, leur abondance relative a pu être corrélée à la progression de la maladie des patients. L’étude approfondie de la biologie de ces cellules souches cancéreuses mais aussi les études utilisant d’autres modèles cellulaires souches (dont les cellules souches pluripotentes) seront probablement nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes à la base de la transformation cellulaire ainsi que les mécanismes biologiques qui gouvernent l’auto renouvellement de ces cellules. Les applications de ces connaissances permettront probablement de mettre au point des thérapeutiques ciblées visant à l’éradication de ces CSC (Frank, Schatton et al., 2010), en particulier en comprenant leurs mécanismes de résistance aux molécules xénobiotiques.

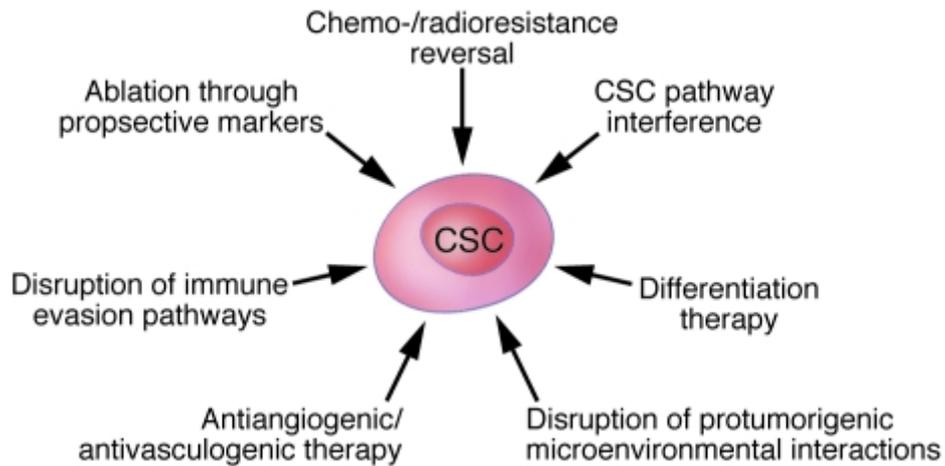


Figure 39: Traitement ciblant les cellules souches cancéreuses (CSC). Ces approches combinées aux traitements actuels pourraient augmenter la réponse thérapeutique et pourrait diminuer le risque de rechute et de dissémination. Ces approches incluent des agents anti-tumorigènes qui ciblent des marqueurs des CSC (anticorps monoclonaux et cellules immunitaires activés) ; des agents ciblant les voies qui confèrent une résistance aux CSC ou en limitant les interactions CSC avec certains éléments du microenvironnement aux propriétés pro-tumorigènes, ou encore privant les cellules de nutriment grâce à des molécules anti-angiogénique et antivascularogénique et enfin en ciblant les mécanismes de la transition épithélio-mésenchymateuse responsables de la dissémination métastatique. (D'après Frank, Schatton *et al.*, 2011)

Dicussion et conclusion générale

Discussion

Après avoir introduit la thématique des cellules souches pluripotentes et avoir donné tout au long de la revue bibliographique un certain nombre d'exemples illustrant le propos, il m'est apparu intéressant dans le cadre de cette thèse de discuter des différents problèmes tant sur les plans éthiques que scientifiques qui pourraient limiter le développement de ces technologies.

1. Problèmes éthiques, juridiques et commerciaux concernant les applications des cellules souches pluripotentes.

Les problèmes éthiques posés par l'utilisation des cellules souches pluripotentes concernent essentiellement les cellules souches embryonnaires humaines. Toutefois, bien que cela soit rarement discuté dans la littérature, le statut des cellules souches induites à la pluripotence pose à mon avis également des problèmes qui seront exposés dans ce chapitre.

1.1. Les cellules souches embryonnaires humaines

- **Le problème de la non-autorisation des recherches sur les cellules hES en France**

Comme nous l'avons décrit dans la revue bibliographique, l'origine « naturelle » des cellules souches pluripotentes est l'embryon au tout début de son développement. C'est cette origine et la nécessité de devoir détruire l'embryon qui pose des problèmes éthiques sur son statut et sur la notion de protection et de respect de la dignité humaine.

En France, ce n'est que très récemment que les chercheurs ont pu envisager d'utiliser les cellules hES. Il aura en effet fallu attendre la loi de bioéthique n° 2004-800 du 6 août 2004, pour qu'un cadre spécifique à la recherche sur l'embryon humain et les cellules hES soit défini. Cette loi interdit explicitement le clonage (article 21), qu'il soit dit « reproductif » ou « thérapeutique », et la recherche sur l'embryon (article 25). Cependant, à titre dérogatoire et pour une période probatoire de cinq ans, le texte précise que « les recherches peuvent être autorisées sur l'embryon et les cellules embryonnaires lorsqu'elles sont susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et à la condition de ne pouvoir être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques ». C'est l'Agence de Biomédecine, une autorité gouvernementale créée par la loi de bioéthique de 2004 et opérationnelle depuis le 5 mai 2005, compétente pour les questions relatives aux greffes d'organes, la reproduction, l'embryologie et la génétique humaine, qui

encadre ces recherches sur les cellules hES. Elle est notamment chargée d'évaluer la pertinence et la finalité thérapeutique des projets de recherche. La décision finale d'autorisation appartient aux ministres de la santé et de la recherche.

Cette loi permet aux chercheurs autorisés de travailler sur des lignées de cellules hES issues d'embryons conçus *in vitro*, mais uniquement dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation effectuée sur le territoire français ou sur des lignées de cellules importées de pays étrangers et créées dans les mêmes conditions. La loi rappelle qu'il est interdit de concevoir des embryons uniquement dans un but de recherche et distingue trois types d'embryons : (1) les embryons surnuméraires ne faisant plus l'objet d'un projet parental. (2) les embryons dont l'état ne permettent pas la réimplantation ou la conservation à des fins de grossesse. (3) les embryons porteurs d'une anomalie recherchée dans le cadre d'un diagnostic préimplantatoire (DPI).

Dans ces trois cas, les embryons peuvent être utilisés, à titre gracieux, à des fins de recherche, seulement après consentement éclairé et écrit des deux parents. Cette autorisation peut par ailleurs être suspendue, avec ou sans préavis, à tout moment en cas de non-respect de la loi.

Les premières autorisations d'importation de lignées de cellules hES porteuses de mutations à l'origine de maladies monogéniques ont été attribuées par l'Agence de Biomédecine en 2005 et les premières autorisations de dérivation et d'amplification ont été attribuées le 19 juin 2006, au Dr M. Peschanski et au Pr S. Viville. Dans le document le plus récent publié en 2009 par le conseil d'état, 43 programmes de recherche ont été autorisés sur 52 demandes et concernent 28 laboratoires : 3 équipes travaillent sur l'embryon entier, 4 ont pour objectifs de développer de nouvelles lignées de cellules hES et 21 travaillent sur des lignées déjà établies qui ont été dérivées en France ou importées de l'étranger.

Comme prévu par la Loi de Bioéthique de 2004, la période de dérogation probatoire des 5 ans s'est achevée et le bilan des résultats des recherches a été évalué conjointement par l'Agence de Biomédecine et l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. Un projet de Loi a été rédigé en décembre 2009 qui vient tout juste d'être voté après de longues discussions. Ainsi la 3^{ème} Loi de Bioéthique de 2011, la Loi n° 2011-814 a été publiée au journal officiel le 8 juillet 2011. Le principe de l'interdiction dérogatoire est maintenu. Dans les faits, cette disposition n'empêche pas les scientifiques de mener leurs travaux de recherche mais il est probable qu'elle freine le développement sur le territoire français de recherche privée dans ce domaine.

- **Le problème de la brevetabilité et de la commercialisation des cellules hES : l'affaire Brüstle contre greenpeace (affaire C34/10)**

En ce qui concerne la notion d'utilisation à des fins industrielles ou commerciales des cellules souches embryonnaires humaines, une affaire juridique opposant l'organisation non gouvernementale de protection de l'environnement greenpeace et le Professeur Olivier Brüstle, neuropathologiste reconnu au centre universitaire médical de Bonn en Allemagne a très récemment posé les bases de la réflexion qui conduira à la jurisprudence européenne sur le sujet. Rappelons brièvement les faits. Le Professeur Brüstle est détenteur d'un brevet allemand déposé le 19 décembre 1997, portant sur des précurseurs neuraux isolés et purifiés ainsi que leur procédé de production à partir des cellules souches embryonnaires et l'utilisation de ces cellules précurseurs neurales dans le cadre de transplantation intra-cérébrale destiné au traitement de nombreuses maladies comme la maladie de Parkinson par exemple comme c'est déjà le cas avec des précurseurs fœtaux. Dès lors, l'organisation Greenpeace a introduit une action visant à obtenir l'annulation du brevet en se basant sur les critères de brevetabilité en vertu de l'article 2 de la loi relative aux brevets, dans sa version en vigueur au 28 février 2005. Le tribunal fédéral des brevets allemands a fait partiellement droit à la demande de Greenpeace et a constaté la nullité du brevet. Après appel de cette décision, la juridiction de renvoi estime que l'issue du présent litige dépend de l'interprétation de certaines dispositions de la directive 98/44. Dans cette affaire, le centre du problème concerne la délicate question de la définition même de l'embryon humain. Si l'on en croit l'analyse et les conclusions de l'avocat général de la cour de Justice de l'union européenne (CJUE), M. Yves Bot, présentées le 10 mars 2011. La définition de l'embryon est rappelée de manière univoque. La notion d'embryon humain s'applique dès le stade de la fécondation aux cellules totipotentes initiales et à l'ensemble du processus de développement et de constitution du corps humain qui en découle. Il en est ainsi, notamment du blastocyste dont dérive les cellules souches embryonnaires. Toutefois, ces dernières n'ont pas à elles seules la capacité de se développer en un être humain et ne relèvent donc pas de la notion d'embryon humain. Enfin, il est rappelé qu'une invention doit être exclue de la brevetabilité lorsque la mise en place du procédé technique soumis au brevet requiert, au préalable, soit la destruction d'embryons humains, soit leur utilisation comme matériel de départ, même si la description du procédé ne contient aucune référence à l'utilisation d'embryons humains, sauf si cette invention a un objectif thérapeutique ou diagnostique pour l'embryon humain lui-même et lui sont utiles. Cet avis a été largement controversé par les experts scientifiques européens du domaine, les incitant à publier le 28 avril 2011 une lettre dans la revue *Nature* (Smith, 2011).

Dans cette lettre, les scientifiques ont exprimé leurs profondes préoccupations dans leurs capacités à coordonner des projets multinationaux européens sur les cellules souches. Les scientifiques affirment que ces cellules ne sont pas des embryons et qu'ils dérivent d'embryons en surnombre obtenus uniquement dans le cadre de procédures d'aide médicale à la procréation et que ces embryons sont destinés à être détruit après une période légale car ils ne peuvent pas être maintenus indéfiniment. Ils soulignent également que d'un point de vue scientifique, il est largement prématuré de remplacer les recherches sur les cellules hES par celles qui utiliseraient des cellules iPS. De plus, ils estiment qu'une telle décision d'interdiction de brevetabilité des inventions exclurait l'industrie pharmaceutique et les entreprises de biotechnologie des efforts de recherche faute de protection juridique.

Ce cas européen n'est pas isolé. Aux Etats-Unis, la fondation des brevets publics (PubPat) tente de faire invalider les brevets contractés par l'équipe de James Thomson sur les cellules hES dont il est l'inventeur des procédés de dérivation et finalement à l'heure actuelle, les opposants au principe de brevetabilité des hES reprennent l'argumentaire européen soulignant les objections morales de ces pratiques.

En conclusion, l'interdiction de brevetabilité des inventions dérivées de l'utilisation des cellules souches embryonnaires nécessitant une destruction de l'embryon est un véritable frein à l'évolution de ces technologies et notamment les plus prometteuses d'entre elles dont nous avons discuté précédemment. Il est possible que la technologie des cellules iPS (ne nécessitant pas de destruction d'embryon) soit une méthode alternative pour un grand nombre d'applications toutefois même si cela est potentiellement vrai, cette conclusion est dans tous les cas trop prématurée comme le reconnaît lui-même le Professeur Shinya Yamanaka, l'inventeur des cellules iPS et comme le souligne l'article paru dans *Cell* en juin 2011. En effet, il est écrit que l'interdiction du travail sur les cellules hES pourrait avoir des effets néfastes sur le développement de la technologie utilisant les cellules hiPS (Scott, McCormick et al., 2011).

Enfin, il est à signaler que le flou laissé par le fait que les inventions sur les cellules souches embryonnaires puissent faire l'objet de brevets et de commercialisation dans le cas où elles seraient obtenues sans destruction de l'embryon laisse clairement entrevoir des dérives. Par exemple, des publications ont montré qu'il était possible de dériver à partir d'un seul blastocyste une lignée de cellules souches en laissant vivant l'embryon. Ce dernier

pouvant ainsi éventuellement être réimplanté (Klimanskaya, Chung et al. 2006; Klimanskaya, Chung et al. 2007).

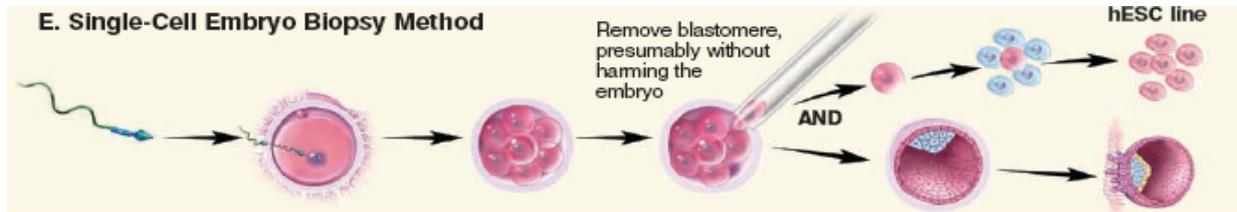


Figure 40 : Dérivation des cellules souches embryonnaires humaines sans destruction d'embryon. Ces lignées sont obtenues à partir de la biopsie d'un blastomère. Banque d'images du NIH. © 2008 Thérèse Winslow.

L'industrialisation de ce procédé à des fins industrielles et commerciales pourrait avoir des conséquences inconnues sur les enfants nés d'embryons qui auraient servis à dériver des cellules souches embryonnaires. De même qu'en est-il des lignées obtenues à partir d'embryons morts ou d'embryon « artificiels » obtenues par parthénogénèse ? Ces lignées possèdent t'elles les mêmes propriétés que les cellules hES ? Ces questions sont débattues.

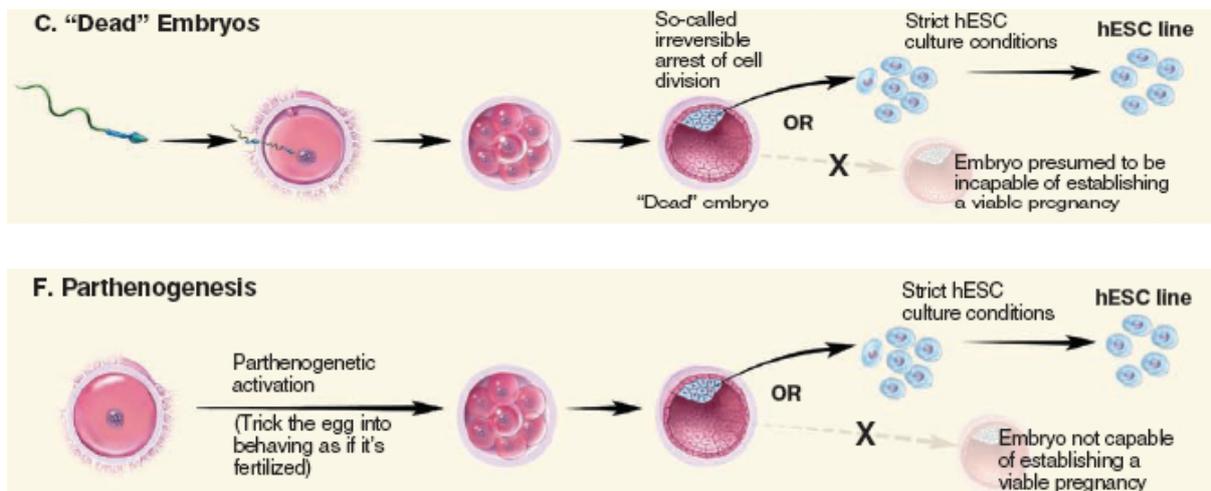


Figure 41 : Obtention de lignées de cellules hES à partir d'embryon mort ou par parthénogénèse. Banque d'images du NIH. © 2008 Thérèse Winslow

Dans ces deux cas, les embryons ne peuvent pas être réimplantés. Les cellules de souches embryonnaires obtenues de cette façon peuvent-elles alors être utilisées pour des applications commerciales?

1.2. Les cellules souches induites à la pluripotence

Si l'on en croit la littérature scientifique, les cellules iPS apportent une solution définitive aux problèmes éthiques puisque celles-ci ont pour origine une cellule somatique et non plus

une cellule embryonnaire. Ainsi, on peut admettre que le consentement éclairé soit recueilli quand à l'utilisation éventuelle de cellules d'un donneur dans le but d'établir des lignées iPS. Toutefois, il a été montré très récemment que les cellules souches induites à la pluripotence pouvaient être obtenues à partir d'un prélèvement aussi anecdotique que celui des cellules fibroblastiques contenues dans les urines (Zhou, Benda et al., 2011) La possibilité d'établir des lignées d'iPS à l'insu d'une personne (que cela soit en détournant un prélèvement obtenu après un acte médical ou même à partir de prélèvement urinaire) laisse entrevoir la nécessité d'une réglementation spécifique, actuellement inexistante. Par ailleurs, le statut même de pluripotence pose un autre problème qui pourrait conduire à de graves dérives puisque ces cellules pourraient se différencier en gamètes pour ensuite donner naissance à un embryon « artificiel ». L'hypothèse est très sérieuse puisqu'une équipe de chercheurs de l'université de Stanford a réussi à produire des cellules haploïdes (cellules qui ne possèdent qu'un seul jeu de chromosome) présentant toutes les caractéristiques des ovules et des spermatozoïdes humains à partir de cellules souches embryonnaires, alors pourquoi pas à partir de cellules iPS. Enfin, la question de la commercialisation de ces cellules n'est, à ce jour, prévue par aucune législation.

2. Problèmes scientifiques et verrous technologiques concernant les cellules souches pluripotentes

La maîtrise des conditions de culture des cellules souches et les moyens de production permettant l'obtention de grandes quantités de cellules de manière reproductible constituent les pré-requis indispensables au déploiement de ces applications dans le futur

2.1 Une meilleure définition des milieux de culture permettant la maîtrise de la prolifération des cellules souches pluripotentes est nécessaire.

La standardisation des milieux de cultures est essentielle pour pouvoir passer à l'industrialisation des technologies basées sur ces cellules. Il s'agit de mettre au point des conditions de culture capables de favoriser la prolifération cellulaire tout en évitant de provoquer des mutations. L'un des premiers défis réside dans la biosécurité. Il faut aussi éviter tout risque de toxicité, non seulement celui éventuellement présenté par la greffe de cellules, mais aussi d'autres, liés à l'apparition de nouvelles maladies, pas encore nécessairement connues et qui pourraient se développer dans les cellules greffées. Si le processus moléculaire de prolifération *in vitro* est maîtrisé pour les cellules souches embryonnaires de souris, ceci n'est pas tout à fait vrai pour leurs homologues humains. De

plus, ces dernières ont une capacité moindre à la prolifération *in vitro* que celles de souris et sont donc par conséquent plus difficile à obtenir en grandes quantités. Il faut éviter tout risque de transformation et de développement tumoral car il existe, dans le génome, des micros régions instables, présentant d'importants risques de duplication ou de délétion.

2.2 La caractérisation précise de l'instabilité génétique des cellules souches pluripotentes et leurs dérivés seront nécessaires

Tous les organismes vivants sont composés de cellules programmées pour accomplir un nombre limité de divisions. Cette limite, appelée limite de Hayflick (Hayflick 1965), se situe chez l'Homme autour d'une cinquantaine de divisions. Une fois ce nombre accompli, les cellules entrent en sénescence. Il peut cependant arriver que des cellules acquièrent des mutations leur permettant de franchir cette limite. *In vitro*, lors de culture à long terme, il a été montré que les cellules somatiques sont susceptibles d'acquérir des mutations qui leur procurent la capacité d'échapper à la sénescence. Ces cellules mutées sont alors capables de se diviser à l'infini. Les seules cellules non transformées ayant *in vitro* le potentiel de se diviser physiologiquement de façon illimitée (auto renouvellement) sans entrer en sénescence sont les cellules souches pluripotentes. Depuis quelques années, des études ont rapporté que bien que cette capacité de multiplication à l'infini soit physiologique, la culture à long terme chromosomique (Lefort, Feyeux et al. 2009). Des modifications telles que des trisomies 12, 17, X et 20 ont été identifiées par différents laboratoires grâce à l'utilisation de techniques de cytogénétiques conventionnelles (bandes G, hybridation *in situ* fluorescente multicolore ou mFISH). Des techniques d'études plus résolutive comme l'hybridation génomique sur puce à ADN (microarray CGH) ou encore les puces à SNP (single nucleotide polymorphism) ont également montré l'existence de petites régions du génome hautement instables (régions 12p13, 20q11.21). Si de nombreux laboratoires se sont penchés sur la question du maintien de l'intégrité génomique des cellules souches pluripotentes humaines au cours du temps, il n'existe en revanche que peu de données sur la stabilité du génome dans leurs dérivés (Conti and Cattaneo; Koch, Opitz et al. 2009).

Etant donné que les progéniteurs dérivés de cellules pluripotentes pourraient à terme être utilisés dans le cadre de thérapies cellulaires et tissulaires. Il apparaît donc essentiel de s'assurer de leur intégrité génomique au cours du temps. A l'heure actuelle, ce contrôle de la stabilité chromosomique des progéniteurs issus de cellules souches pluripotentes n'est que rarement réalisé dans les laboratoires de recherche même si des programmes de recherche

telle que ESTOOLS commencent à s'intéresser à ce problème. D'autant qu'un travail initié au laboratoire I-Stem auquel j'ai pu participer vient de mettre en évidence la présence d'une anomalie récurrente dans les lignées de cellules souches neurales dérivées de cellules hES et hiPS cultivées pendant de longues périodes. D'une manière plus générale, il semble par ailleurs indispensable de comprendre les conséquences que pourraient avoir ces anomalies dans une condition de greffe. Le travail est fastidieux mais la méconnaissance de ces mécanismes pourrait compromettre sérieusement l'utilisation de ces cellules en thérapie cellulaire et entraîner des biais dans les résultats des tests cellulaires basés sur ces cellules.

2.3 Le développement de condition de différenciation guidée des cellules souches pluripotentes vers certains phénotypes sera un défi scientifique majeur

Comme nous l'avons dit précédemment, le caractère pluripotent des cellules souches embryonnaires ou induites à la pluripotence désigne leurs potentialités théoriques à donner toutes les cellules du corps humain. Si l'on prend en compte seulement des cellules qui pourraient être reconnues sur des critères morphologiques et fonctionnels, il existe au moins 210 types de cellules différenciées adultes différentes qui ont été listés dans le livre de « biologie moléculaire de la cellule » (page 1188). Cette propriété de pluripotence des cellules souches hES et hiPS ne signifie pas que cette différenciation est possible techniquement *in vitro*.

Un certain nombre de phénotype peut être obtenu plus ou moins facilement mais peu de phénotypes peuvent l'être directement par différenciation guidée de manière homogène à partir des cellules souches pluripotentes. Les deux principaux problèmes sont le manque de marqueurs qui permettraient l'enrichissement des cellules à partir d'une population hétérogène et/ou la non connaissance des conditions nécessaires permettant l'obtention de certains phénotypes.

La plupart des protocoles de différenciation récents proposent de suivre étape par étape le développement embryonnaire en reproduisant *in vitro* l'induction de certains tissus grâce aux molécules ou aux protéines recombinantes qui peuvent être obtenues avec une grande pureté permettant de mimer ce qui se passe au niveau de l'embryon. Pour plusieurs phénotypes les mécanismes développementaux ne sont pas encore complètement élucidés. Pour de nombreux phénotypes, c'est l'étape de différenciation terminale qui pose problème. C'est le cas pour les hépatocytes dont nous avons parlé dans la revue bibliographique mais c'est également vrai pour le tissu rénal.

L'une des solutions envisagées consiste à réaliser des criblages à haut débit en confrontant des progéniteurs à des bibliothèques de plusieurs dizaines, voir centaines de milliers de molécules et d'ensuite suivre par une méthode compatible l'apparition d'un phénotype. Le développement d'autres méthodes de cultures sur des supports différents parfois en 3-D ou des co-cultures sont également des pistes de recherche envisagées.

3. Problèmes spécifiques concernant l'utilisation des cellules souches pluripotentes pour des applications innovantes en thérapie cellulaire

3.1 Absence de réglementation et d'harmonisation internationale

La législation européenne sur les thérapies cellulaires est basée sur plusieurs directives qui ne tiennent pas compte des spécificités liées aux cellules pluripotentes*. La réglementation européenne sur les « advanced therapy medicinal products » (ATMPs) est en place depuis décembre 2008 et est applicable à l'ensemble des pays membres mais cette réglementation même si elle reconnaît la spécificité de « médicaments » basés sur du matériel cellulaire ne prévoit pas de disposition particulière aux thérapeutiques basés sur les cellules souches ou « stem-cell-based medical products ». A l'heure d'aujourd'hui, aucune autorisation de mise sur le marché de tel produit n'a été accordée. Toutefois, la commission spécialisée de l'agence européenne du médicament (EMA) a rédigé en 2011 un document de réflexion afin d'établir des standards garantissant la qualité de la sécurité et de l'efficacité des produits†. Parmi ces recommandations, il est nécessaire de réaliser un certain nombre de test au moment de l'administration des cellules aux patients basés sur des biomarqueurs cellulaires notamment pour s'assurer de l'identité des cellules ainsi que le suivi de biomarqueurs qui permettront de monitorer les cellules une fois administrées *in-vivo*. Il est clair que pour bon nombre de produits ces biomarqueurs ne sont pas connus.

Aux Etats-Unis, l'utilisation des produits de thérapie cellulaire est codifiée dans le Code of Federal Regulation et un document de l'agence de sécurité des médicaments américains

* Directive 2003/63/EC sur les produits de thérapie cellulaire comme produits cliniques ; la directive 2001/20/EC sur les essais cliniques des produits de thérapie cellulaire ; la directive 2004/23/EC qui établit les standards de qualité, la procédure des dons et de la distribution des tissus et cellules humaines.

† Reflection paper on stem cell-based medicinal products. Committee for Advanced Therapies EMA/CAT/571134/2009.2011.1-14;

(FDA) un document sur les produits de thérapie cellulaire et génique [‡] définissent le cadre législatif américain. La classification des produits thérapeutiques est basée sur le type d'indication. Certaines restrictions existent concernant les fonds fédéraux permettant de financer les recherches sur ces produits mais il n'existe pas de limitation aux recherches effectuées par des fonds privés y compris sur les hES. Des règles ont été édicté dans 3 domaines : (1) La vérification de l'absence de contamination des tissus ou des cellules contaminés (par exemple par le virus HIV ou HBV), (2) les règles de préparation des produits permettant de prévenir les dommages et la contamination des produits, (3) la sécurité clinique des produits.

En conclusion, la conférence internationale sur l'harmonisation des procédés pour l'accréditation des médicaments utilisés chez l'Homme, n'a pas édicté de directive officielle sur les produits basés sur les cellules souches. Bien que la société internationale de recherche sur les cellules souches (ISSCR) ait formulé des recommandations, il s'agit plutôt de règles de bonne conduite professionnelle. Quand aux produits utilisant des cellules souches pluripotentes, on est encore bien loin d'avoir des recommandations officielles. Toutefois, les règles générales et surtout les règles de « bon sens » respectant les conditions GMP (good manufacturing procedures) s'appliquent aux cellules souches pluripotentes tout comme aux autres produits de thérapie cellulaire déjà utilisés en thérapeutique.

3.2 Le problème de la sécurisation du greffon

- **Le risque de présence résiduelle de cellules indifférenciées dans le greffon**

La possibilité de persistance de cellules indifférenciées dans le greffon après plusieurs semaines de différenciation vers un type particulier de cellules est du principalement à la non synchronisation des cultures (Figure 43A). Il pourrait également être du à la présence dans la population de cellules souches hES de sous types cellulaires répondant de manière différente aux stimuli exogènes imposant une pression sélective. Comme nous l'avons décrit dans la revue bibliographique, la présence de cellules indifférenciées peut entraîner l'apparition de tératome, il est donc crucial de développer des méthodes de sélection (par exemple par tri cellulaire) et de vérifier l'absence de ces cellules dans le greffon final.

[‡] US Food and Drug administration. Guidance for Human somatic cell therapy, FDA centers for Biologics Evaluation and research.

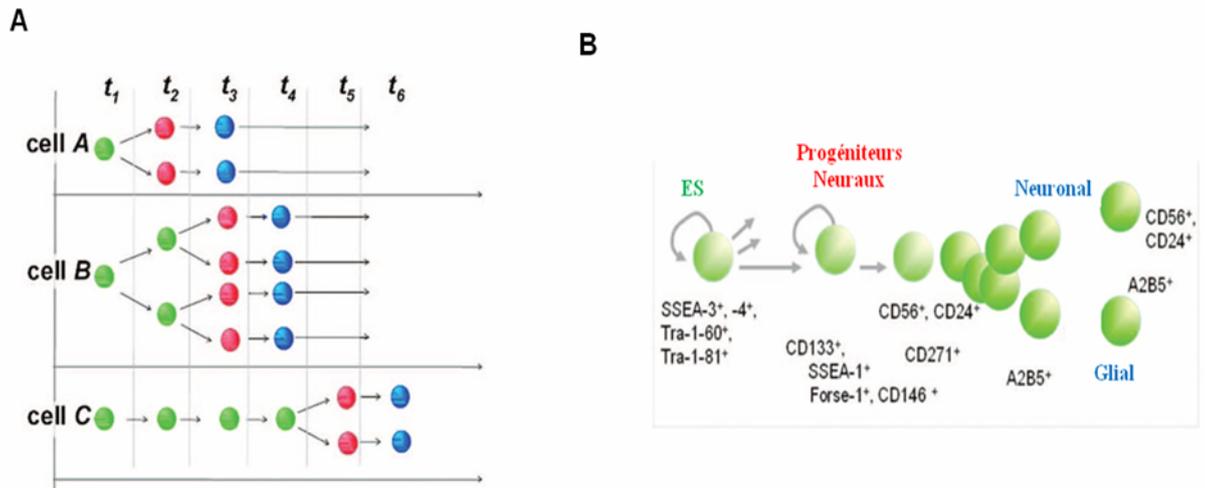


Figure 43: Choix d'un marqueur d'homogénéisation des cultures et tri cellulaire.

(A) Schéma représentant l'hétérogénéité des cultures cellulaires au cours de protocoles de différenciation guidée à un temps t. Les ronds verts représentent les cellules à l'état indifférencié, les ronds rouges représentent des progéniteurs et les ronds bleus correspondent à des cellules plus différenciées (B) Revue bibliographique des marqueurs de surface au cours de la différenciation neurale à partir des cellules hES. Ces marqueurs pourraient permettre d'enrichir les greffons en cellules d'intérêt en excluant les cellules indifférenciées (Adapté de Pruszek, Sonntag et al. 2007).

- **Le risque de surprolifération du greffon**

Par ailleurs, une étude récente rapportée par des chercheurs d'I-Stem a montré que la présence dans le greffon de cellules à l'état indifférencié n'était pas le seul problème et que des cellules partiellement différenciées à partir de cellules hES pouvaient être responsables de surcroissance cellulaire. En effet, lorsque l'on greffe des progéniteurs neuraux moyens épineux obtenus par différenciation guidée des cellules hES dans le striatum de rat, ceux-ci peuvent proliférer et sont capables de générer après 3-5 mois des surcroissances cellulaires massives (Aubry, Bugi et al. 2008) (Figure 43).

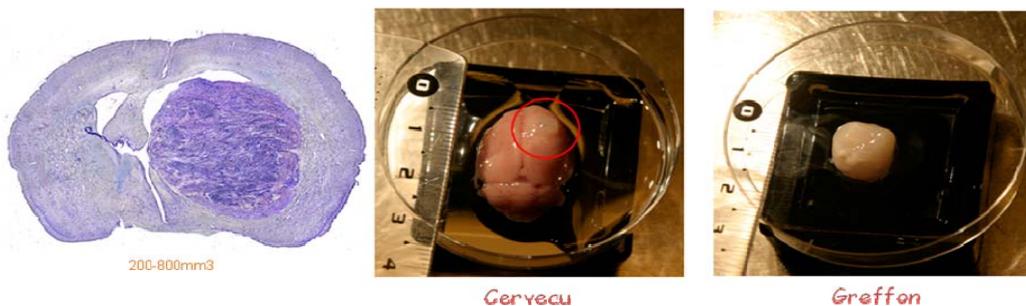


Figure 43 : Observation d'une sur-prolifération du greffon comprimant le parenchyme cérébral. (D'après Aubry et al, 2008).

Ces considérations obligent les chercheurs à concevoir, en amont, de nouvelles stratégies de sécurisation du greffon. Il est par exemple théoriquement possible de réaliser le même type de différenciation mais à partir de cellules hES modifiées exprimant de manière stable une construction de type gène suicide, tel que la Thyrosine kinase, qui permet d'éliminer le greffon en cas de sur-prolifération par administration au patient d'une molécule substrat dont le produit est toxique. Ce principe a déjà été utilisé avec succès en hématologie pour prévenir les effets délétères de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (Ciceri, Bonini et al. 2005).

3.3 Problèmes spécifiques posées par les cellules iPS en thérapie cellulaire

En plus des difficultés déjà évoquées pour la thérapie cellulaire basée sur les cellules hES, la technique utilisée pour la reprogrammation entraîne un certain nombre de problèmes intrinsèques qui sont des obstacles à des applications cliniques immédiates.

3.3.1 Risque de transformation en cellules cancéreuses.

L'utilisation de rétrovirus lors de la reprogrammation peut causer un risque d'intégration d'un transgène de manière aléatoire dans le génome pouvant alors provoquer des mutations insertionnelles à l'origine de cancer (Hacein-Bey-Abina, Von Kalle et al. 2003). Pourtant le système utilisant le rétrovirus MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) présente, outre ces propriétés d'infection élevées, des avantages importants pour la reprogrammation expérimentale : il permet de délivrer une expression constante de transgène qui s'éteint naturellement une fois la reprogrammation achevée, due à des modifications épigénétiques du promoteur viral intervenant dans des cellules à l'état indifférencié (Matsui, Leung et al., 2011). Une solution qui autoriserait l'utilisation de rétrovirus en toute sécurité pourrait venir du développement de séquenceurs à ADN de nouvelle génération permettant dans un avenir proche de cribler en quelques heures le génome de plusieurs clones d'iPS à la recherche d'éléments intégratifs et ainsi d'écarter ceux qui présenteraient une mutation insertionnelle (Nakayama 2009). Toutefois, les méthodes actuelles privilégient l'utilisation de méthodes d'expression transitoire des facteurs de pluripotence. Ces méthodes présentées dans la revue bibliographique sont moins efficaces mais plus sûres pour une utilisation en thérapie cellulaire.

Un autre problème fondamental est l'utilisation d'oncogène tel que cMyc dans le processus de reprogrammation qui rend cette technique inutilisable pour générer des cellules hiPS dans des conditions cliniquement acceptables. La sécurisation du mode de production des cellules hiPS passe nécessairement par la suppression de l'utilisation de cet oncogène. Ce problème a trouvé rapidement une solution puisqu'il n'est pas indispensable à la reprogrammation même s'il augmente son rendement (Nakagawa, Koyanagi et al. 2008). Toutefois, il n'est pas clair que la réactivation de l'un des autres gènes, *OCT4*, *KLF4* ou *SOX2*, ne puisse pas générer également des tumeurs. En conclusion, l'induction expérimentale de la pluripotence dans des conditions de grade clinique GMP inclura probablement la possibilité de reprogrammation par des méthodes non virales, par de petites molécules ou par la transduction de protéines.

3.3.2 Risque de rejet immunitaire des cellules iPS.

Un article publié en Mai 2011 dans Nature par le Professeur Yang Xu, professeur de biologie à l'Université de Californie à San Diego a montré l'existence d'un autre problème, celui du rejet immunitaire des cellules iPS (Zhao, 2011) .

Ces recherches indiquent que, contrairement aux dérivés des cellules souches hES, l'expression « anormale » de gènes dans certaines cellules différenciées à partir iPS peut induire une réponse immunitaire dépendante des lymphocytes T chez les receveurs syngéniques. Cette réaction immunitaire s'est produite à partir d'un type particulier de cellules iPS mais on ignore les causes et surtout l'ampleur du problème qui pourrait certainement devenir majeur et fortement freiner le développement des applications de thérapie cellulaire issues des cellules iPS.

4. Problèmes posés par l'utilisation des cellules souches pluripotentes en tant que modèle cellulaire.

4.1. Acceptation des modèles cellulaires utilisant les cellules souches pluripotentes par les agences réglementaires.

La diffusion de la technologie utilisant les cellules souches comme méthodes alternatives à celles actuellement utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour la détermination des effets toxiques d'une substance passe nécessairement par une acceptation de ces technologies par les

agences réglementaires. Il ne s'agit pas d'ajouter de nouveaux tests mais bien de remplacer ceux existants par des tests plus prédictifs et de remplacer chaque fois que cela sera possible les tests utilisant les animaux par des tests *in-vitro* de performance égale ou supérieure. Ce principe est réaffirmé dans plusieurs réglementations européennes et américaines. D'autre part, de nombreux industriels s'accordent à reconnaître que certains tests existants utilisant des animaux, par exemple ceux réalisés en vue de la détermination de la toxicité développementale, de la cardiotoxicité, de l'immuno-toxicité ou encore de l'hépatotoxicité ne sont pas satisfaisants. Cela est du notamment à de nombreuses différences inter espèces. A la lumière de ces éléments, il semble vraisemblable que les modèles utilisant les cellules souches pluripotentes puissent trouver de nombreuses applications dans ce domaine.

4.2 Utilisation des cellules souches pluripotentes pour la modélisation pathologique : jusqu'où peut on généraliser ce concept ?

Dans la mesure où mon travail de doctorat de biologie cellulaire et moléculaire a porté sur la validation du concept de modélisation pathologique des maladies monogéniques par l'utilisation des cellules souches pluripotentes, j'apporterai dans cette discussion quelques éléments de réflexion concernant la généralisation de cette approche.

Les premières limitations de cette généralisation viennent du fait que l'accès aux lignées de cellules hES mutantes soit restreint d'une part par les indications du diagnostic préimplantatoire mais aussi par des questions d'ordre éthique. La génération de cellules iPS spécifiques de patients que nous avons présentée lors de la revue bibliographique et qui possède des propriétés très proches des cellules hES, devrait permettre de contourner ces deux limitations.

Par contre si au moins en théorie, toutes les maladies sont potentiellement modélisables, certaines de part leurs caractéristiques peuvent présenter un choix intéressant ou au contraire des limitations.

- **Les maladies où il n'y a pas de modèles animaux disponibles**

Les modèles de souris transgéniques ont apporté et continueront d'apporter des informations pertinentes sur la physiopathologie des maladies, y compris chez l'Homme. Cependant, malgré un haut niveau d'homologie génétique existant entre la souris et l'Homme, certains modèles de souris échouent à reproduire ou ne reproduisent que partiellement le ou

les phénotypes de la maladie humaine. De nombreux exemples existent, comme par exemple le cas de l'anémie de Fanconi. Il s'agit d'une maladie autosomique récessive caractérisée par une aplasie de la moelle osseuse, des anomalies congénitales touchant le squelette avec une pigmentation de la peau et une malformation de l'appareil urinaire (Alter, 1996). D'un point de vue moléculaire, la mutation responsable de la maladie entraîne des anomalies de réparation de l'ADN. Les animaux modèles de la maladie reproduisent ces défauts moléculaires, mais il n'y a pas d'aplasie de la moelle osseuse qui représente l'anomalie centrale de la maladie (Chen et al., 1996). Aussi, la possibilité de différencier les cellules hES ou les iPS mutantes en cellules progénitrices hématopoïétiques offrirait la possibilité d'étudier cette anomalie. Un deuxième exemple est celui du syndrome de Lesch Nyhan. Dans ce cas, des cellules hES normales ont été modifiées en introduisant une mutation dans le gène causal de la maladie, le gène *HPRT1* (Urbach and Benvenisty, 2009; Zwaka and Thomson, 2003). Il s'agit d'un déficit génétique impliquant l'enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase entraînant une accumulation d'acide urique et un retard de développement avec hypotonie généralisée de l'enfant. Dans le cas de cette maladie, il n'existe pas de modèles animaux murins car l'acide urique est métabolisé différemment chez la souris. Ainsi le modèle de cellules hES qui reproduit cette augmentation d'acide urique en mimant la maladie observée chez les patients peut permettre de d'étudier la physiopathologie de ce syndrome.

En ce qui concerne les maladies neurodégénératives, ce sont généralement des maladies difficiles à modéliser car, pour plusieurs d'entre elles, les animaux mutants ne reproduisent pas de phénotype pathologique. Par exemple, les animaux portant des mutations associées aux formes familiales de la maladie de Parkinson, ne reproduisent pas la perte sélective de neurones dopaminergiques de la substance noire. Dans l'atrophie musculaire spinale (SMA), la pathogénèse nécessite la co-expression de deux gènes *SMN1* et *SMN2*, ce dernier étant absent des modèles de souris.

Comme nous l'avons mentionné dans la revue bibliographique, les premières lignées iPS générées à partir de fibroblastes de patients ont concerné précisément ce type de maladies neurodégénératives dont l'Atrophie spinale musculaire (SMA) (Ebert et al., 2009), l'amyotrophie sclérosante latérale (ALS) (Dimos et al., 2008) et la maladie de Parkinson (PD) (Soldner et al., 2009). Cependant, ces premiers travaux n'ont pas permis de mettre en évidence de phénotypes pathognomoniques de ces maladies. Par exemple dans le cas de la maladie de Parkinson, il n'y avait pas dans les neurones de corps de Lewy, les inclusions caractéristiques de cette maladie (Soldner et al., 2009).

- **Les maladies monogéniques d'apparition tardive**

Ces premiers éléments amènent à réfléchir sur la pertinence de l'utilisation de cellules d'origine embryonnaire pour modéliser des maladies de l'adulte.

En utilisant les cellules hES dans le cas de la DM1, nous avons pu observer la présence de foci dans l'une des lignée qui présentait moins de 1000 répétitions CTG, mimant les mécanismes intervenant dans la forme classique de la maladie dont les symptômes cliniques n'apparaissent que tardivement à l'âge adulte. Ceci suggère que les manifestations toxiques débutent dès les premiers stades du développement. Le corolaire est que l'on peut imaginer l'existence de mécanismes de protection mis en place dans la cellule pour lutter contre les effets délétères de la mutation et que l'apparition de la maladie soit en réalité le résultat d'une décompensation de ces systèmes.

L'identification de tels mécanismes pourrait offrir des solutions thérapeutiques à visée préventive dans ce type de maladie

Par contre, en ce qui concerne les iPS, on sait maintenant qu'au cours de la reprogrammation, bien que l'information génétique ne soit pas modifiée, le processus s'accompagne d'un « effacement » de la signature épigénétique des fibroblastes malades. Ces cellules, ainsi reprogrammées dans un état embryonnaire, ne seraient alors pas toujours associées aux mêmes mécanismes pathologiques que la cellule à l'état adulte. Ces observations ont conduit certains auteurs à considérer que les maladies génétiques héréditaires à pénétrance élevée et d'apparition précoce seraient plus faciles à modéliser que les maladies de survenue tardive (« Late onset disease ») (Yamanaka, 2009).

- **Les maladies monogéniques altérant le développement embryonnaire**

Le modèle de cellules souches embryonnaires représente certainement une opportunité unique pour la modélisation des anomalies du développement humain causées par une mutation. Comme nous l'avons décrit dans la revue bibliographique, il existe de nombreux arguments qui permettent de considérer que les cellules hES -et on peut penser qu'il en est de même avec les cellules iPS- reproduisent *in vitro* les stades précoces du développement. Une étude a rapporté les changements épigénétiques intervenant dans le contexte du syndrome de l'X fragile (Eiges et al., 2007). Ce syndrome résulte de l'inactivation du gène *FMRI* due à l'expansion de triplet CGG dans la région 5'UTR du gène. Les événements responsables de

l'inhibition de *FMR1* n'ont pas été complètement élucidés notamment à cause de l'absence de modèle animal ou cellulaire. Ce modèle reproduit au cours de la différenciation des cellules hES la diminution pathologique du gène accompagnée par des anomalies épigénétiques et permet ainsi de disséquer la séquence des événements accompagnant ces modifications. Cette étude pose les bases de cette preuve de concept.

Les maladies associées à des malformations congénitales ont pour la plupart une cause génétique[§] et concernent le plus souvent des mutations sur des gènes du développement. Il est vraisemblable que les cellules pluripotentes humaines mutantes pour l'un de ces gènes puissent participer à une meilleure dissection des mécanismes physiopathologiques mis en jeu.

[§] Hors causes environnementales, iatrogéniques ou tératogéniques

Conclusion

La quête de la pluripotence commencée il y a plus de 60 ans par les premières expériences de transfert de noyau a finalement abouti ! Avec la possibilité de dériver des cellules souches embryonnaires humaines, les chercheurs avaient pour la première fois la possibilité d'étudier les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la pluripotence chez l'Homme. Toutefois, ces recherches passionnantes sont freinées par les problèmes éthiques qui entourent l'utilisation de ces cellules en tant que matériel biologique d'étude. Finalement, les enjeux en terme d'applications étant très importants, certains pays ont autorisé ces recherches. C'est le cas aux Etats-Unis, même si c'est le secteur privé qui a financé une grande partie du travail de recherche et que l'état fédéral a refusé, sous administration du président G.W. Bush, de financer ces travaux. En France, la recherche sur les cellules souches embryonnaires est interdite (pour le principe) mais la Loi prévoit un système de dérogations accordées par l'Agence de Biomédecine qui permet aux chercheurs de travailler sur ces cellules dans la mesure où leurs « applications sont susceptibles de donner des résultats majeurs ». Ceci vient d'être réaffirmé par l'Etat français dans le cadre de la nouvelle Loi de Bioéthique qui a été votée cet été par le parlement et le Sénat au terme de discussions vives.

S'il est bien une révolution scientifique comme la science en connaît parfois, la découverte de la possibilité d'induire la pluripotence dans des cellules somatiques grâce à l'expression transitoire d'un (petit) nombre de gènes clés est indiscutablement un changement de paradigme fondamental. Cette découverte montre surtout l'extrême plasticité des cellules à un niveau jusqu'alors insoupçonné qui laisse présager de nombreuses applications médicales et pharmaceutiques que nous avons présenté dans cette thèse.

Avec les cellules souches pluripotentes, nous sommes au début d'une histoire scientifique nouvelle. Cependant, l'application de ces technologies nécessitera de nombreux développements avant que leur utilisation en routine soit acceptée par les cliniciens, les industriels de la pharmacie et les agences réglementaires. Le pharmacien de demain aura très probablement un rôle important à jouer dans le développement de ces applications pour permettre de transposer le concept à la réalité clinique au bénéfice des patients et de la santé publique.

Bibliographie

Aasen, T., A. Raya, et al. (2008). "Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes." Nat Biotechnol **26**(11): 1276-84.

Adewumi, O., B. Aflatoonian, et al. (2007). "Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative." Nat Biotechnol **25**(7): 803-16.

Alper, J. (2009). "Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product." Nat Biotechnol **27**(3): 213-4.

Amabile, G. and A. Meissner (2009). "Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine." Trends Mol Med **15**(2): 59-68.

Amit, M., M. K. Carpenter, et al. (2000). "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture." Dev Biol **227**(2): 271-8.

Andrews, P. W. (1998). "Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article." Apmis **106**(1): 158-67; discussion 167-8.

Anson, B. D., K. L. Kolaja, et al. "Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology." Clin Pharmacol Ther **89**(5): 754-8.

Ao, A., J. Hao, et al. "Regenerative chemical biology: current challenges and future potential." Chem Biol **18**(4): 413-24.

Armstrong, L., M. Lako, et al. (2000). "mTert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells." Mech Dev **97**(1-2): 109-16.

Assady, S., G. Maor, et al. (2001). "Insulin production by human embryonic stem cells." Diabetes **50**(8): 1691-7.

Assou, S., T. Le Carrour, et al. (2007). "A meta-analysis of human embryonic stem cells transcriptome integrated into a web-based expression atlas." Stem Cells **25**(4): 961-73.

Aubry, L., A. Bugi, et al. (2008). "Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(43): 16707-12.

Avery, S., G. Zafarana, et al. "The Role of SMAD4 in Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Stem Cell Fate." Stem Cells.

Bachoud-Levi, A. C. (2009). "Neural grafts in Huntington's disease: viability after 10 years." Lancet Neurol **8**(11): 979-81.

Barberi, T., L. M. Willis, et al. (2005). "Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells." PLoS Med **2**(6): e161.

Barker, N., M. van de Wetering, et al. (2008). "The intestinal stem cell." Genes Dev **22**(14): 1856-64.

Baxter, M. A., C. Rowe, et al. "Generating hepatic cell lineages from pluripotent stem cells for drug toxicity screening." Stem Cell Res **5**(1): 4-22.

Ben-Yosef, D., M. Malcov, et al. (2008). "PGD-derived human embryonic stem cell lines as a powerful tool for the study of human genetic disorders." Mol Cell Endocrinol **282**(1-2): 153-8.

Bernstein, B. E., T. S. Mikkelsen, et al. (2006). "A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells." Cell **125**(2): 315-26.

Bernstein, E., S. Y. Kim, et al. (2003). "Dicer is essential for mouse development." Nat Genet **35**(3): 215-7.

Bigdeli, N., C. Karlsson, et al. (2009). "Coculture of human embryonic stem cells and human articular chondrocytes results in significantly altered phenotype and improved chondrogenic differentiation." Stem Cells **27**(8): 1812-21.

Blackburn, E. H. (1991). "Structure and function of telomeres." Nature **350**(6319): 569-73.

Blin, G., D. Nury, et al. "A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates." J Clin Invest.

Boyer, L. A., T. I. Lee, et al. (2005). "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells." Cell **122**(6): 947-56.

Boyer, L. A., K. Plath, et al. (2006). "Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells." Nature **441**(7091): 349-53.

Brimble, S. N., X. Zeng, et al. (2004). "Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001." Stem Cells Dev **13**(6): 585-97.

Bushati, N. and S. M. Cohen (2007). "microRNA functions." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 175-205.

Byrne, J. A., D. A. Pedersen, et al. (2007). "Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer." Nature **450**(7169): 497-502.

Cai, J., Y. Zhao, et al. (2007). "Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells." Hepatology **45**(5): 1229-39.

Calhoun, J. D., R. R. Rao, et al. (2004). "Transcriptional profiling of initial differentiation events in human embryonic stem cells." Biochem Biophys Res Commun **323**(2): 453-64.

Campbell, K. H., J. McWhir, et al. (1996). "Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line." Nature **380**(6569): 64-6.

Candi, E., D. Dinsdale, et al. (2007). "TAp63 and DeltaNp63 in cancer and epidermal development." Cell Cycle **6**(3): 274-85.

Carpenter, M. K., M. S. Inokuma, et al. (2001). "Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells." Exp Neurol **172**(2): 383-97.

Carpenter, M. K., E. S. Rosler, et al. (2004). "Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system." Dev Dyn **229**(2): 243-58.

Cazillis, M., S. Rasika, et al. (2006). "In vitro induction of neural differentiation of embryonic stem (ES) cells closely mimics molecular mechanisms of embryonic brain development." Pediatr Res **59**(4 Pt 2): 48R-53R.

Chadwick, K., L. Wang, et al. (2003). "Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells." Blood **102**(3): 906-15.

Chambers, I., D. Colby, et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell **113**(5): 643-55.

Chambers, S. M., C. A. Fasano, et al. (2009). "Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling." Nat Biotechnol **27**(3): 275-80.

Chiao, E., M. Elazar, et al. (2008). "Isolation and transcriptional profiling of purified hepatic cells derived from human embryonic stem cells." Stem Cells **26**(8): 2032-41.

Chin, M. H., M. J. Mason, et al. (2009). "Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures." Cell Stem Cell **5**(1): 111-23.

Chung, S., B. S. Shin, et al. (2006). "Genetic selection of sox1GFP-expressing neural precursors removes residual tumorigenic pluripotent stem cells and attenuates tumor formation after transplantation." J Neurochem **97**(5): 1467-80.

Ciceri, F., C. Bonini, et al. (2005). "Modulation of GvHD by suicide-gene transduced donor T lymphocytes: clinical applications in mismatched transplantation." Cytotherapy **7**(2): 144-9.

Collins, C. A., I. Olsen, et al. (2005). "Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche." Cell **122**(2): 289-301.

Conti, L. and E. Cattaneo "Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities?" Nat Rev Neurosci **11**(3): 176-87.

Cortes, J. L., L. Sanchez, et al. (2008). "Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of inner cell mass isolation and embryonic stem cell derivation from good- and poor-quality mouse embryos: new insights for derivation of human embryonic stem cell lines." Stem Cells Dev **17**(2): 255-67.

Cowan, C. A., J. Atienza, et al. (2005). "Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells." Science **309**(5739): 1369-73.

de Lange, T. (2002). "Protection of mammalian telomeres." Oncogene **21**(4): 532-40.

de Peppo, G. M., S. Svensson, et al. "Human Embryonic Mesodermal Progenitors Highly Resemble Human Mesenchymal Stem Cells and Display High Potential for Tissue Engineering Applications." Tissue Eng Part A.

Delorme, B., J. Ringe, et al. (2009). "Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity." Stem Cells **27**(5): 1142-51.

Denis, J. A., C. Rochon-Beaucourt, et al. "Global transcriptional profiling of neural and mesenchymal progenitors derived from human embryonic stem cells reveals alternative developmental signaling pathways." Stem Cells Dev **20**(8): 1395-409.

Dimos, J. T., K. T. Rodolfa, et al. (2008). "Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons." Science **321**(5893): 1218-21.

Ding, V., A. B. Choo, et al. (2006). "Deciphering the importance of three key media components in human embryonic stem cell cultures." Biotechnol Lett **28**(7): 491-5.

Do, J. T. and H. R. Scholer "Cell fusion-induced reprogramming." Methods Mol Biol **636**: 179-90.

Duan, Y., A. Catana, et al. (2007). "Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo." Stem Cells **25**(12): 3058-68.

Dvash, T., D. Ben-Yosef, et al. (2006). "Human embryonic stem cells as a powerful tool for studying human embryogenesis." Pediatr Res **60**(2): 111-7.

Dvash, T., Y. Mayshar, et al. (2004). "Temporal gene expression during differentiation of human embryonic stem cells and embryoid bodies." Hum Reprod **19**(12): 2875-83.

Ebert, A. D., J. Yu, et al. (2009). "Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient." Nature **457**(7227): 277-80.

Eiges, R., M. Schuldiner, et al. (2001). "Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells." Curr Biol **11**(7): 514-8.

Eiselleova, L., I. Peterkova, et al. (2008). "Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells." Int J Dev Biol **52**(4): 353-63.

Endoh, M., T. A. Endo, et al. (2008). "Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity." Development **135**(8): 1513-24.

Eulalio, A., E. Huntzinger, et al. (2008). "Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing." Cell **132**(1): 9-14.

Eulalio, A., E. Huntzinger, et al. (2009). "Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation." Rna **15**(1): 21-32.

Farh, K. K., A. Grimson, et al. (2005). "The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution." Science **310**(5755): 1817-21.

Frank, N. Y., T. Schatton, et al. "The therapeutic promise of the cancer stem cell concept." J Clin Invest **120**(1): 41-50.

French, A. J., C. A. Adams, et al. (2008). "Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts." Stem Cells **26**(2): 485-93.

Friedrich Ben-Nun, I. and N. Benvenisty (2006). "Human embryonic stem cells as a cellular model for human disorders." Mol Cell Endocrinol **252**(1-2): 154-9.

Frumkin, T., M. Malcov, et al. "Human embryonic stem cells carrying mutations for severe genetic disorders." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **46**(3-4): 327-36.

Gambara, K., E. Aberdam, et al. (2006). "BMP-4 induces a Smad-dependent apoptotic cell death of mouse embryonic stem cell-derived neural precursors." *Cell Death Differ* **13**(7): 1075-87.

Garcia-Castro, J., C. Trigueros, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool." *J Cell Mol Med* **12**(6B): 2552-65.

Genschow, E., H. Spielmann, et al. (2004). "Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests." *Altern Lab Anim* **32**(3): 209-44.

Genschow, E., H. Spielmann, et al. (2002). "The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. European Centre for the Validation of Alternative Methods." *Altern Lab Anim* **30**(2): 151-76.

Gong, G., D. Ferrari, et al. "Direct and progressive differentiation of human embryonic stem cells into the chondrogenic lineage." *J Cell Physiol*.

Gonzalez, R., L. L. Jennings, et al. "Screening the mammalian extracellular proteome for regulators of embryonic human stem cell pluripotency." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(8): 3552-7.

Graham, V., J. Khudyakov, et al. (2003). "SOX2 functions to maintain neural progenitor identity." *Neuron* **39**(5): 749-65.

Guenou, H., X. Nissan, et al. (2009). "Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study." *Lancet* **374**(9703): 1745-53.

Gurdon, J. B., T. R. Elsdale, et al. (1958). "Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei." *Nature* **182**(4627): 64-5.

Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, et al. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." *Science* **302**(5644): 415-9.

Hanna, J., M. Wernig, et al. (2007). "Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin." *Science* **318**(5858): 1920-3.

Hay, D. C., D. Zhao, et al. (2008). "Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo." *Stem Cells* **26**(4): 894-902.

Hay, D. C., D. Zhao, et al. (2007). "Direct differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells exhibiting functional activities." *Cloning Stem Cells* **9**(1): 51-62.

Hayflick, L. (1965). "The Limited In Vitro Lifetime Of Human Diploid Cell Strains." *Exp Cell Res* **37**: 614-36.

Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." *Exp Cell Res* **25**: 585-621.

Heins, N., M. C. Englund, et al. (2004). "Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells." *Stem Cells* **22**(3): 367-76.

Hemmati-Brivanlou, A. and D. Melton (1997). "Vertebrate neural induction." Annu Rev Neurosci **20**: 43-60.

Hoffman, L. M. and M. K. Carpenter (2005). "Human embryonic stem cell stability." Stem Cell Rev **1**(2): 139-44.

Hotta, R., L. Pepdjonovic, et al. (2009). "Small-molecule induction of neural crest-like cells derived from human neural progenitors." Stem Cells **27**(12): 2896-905.

Houbaviy, H. B., L. Dennis, et al. (2005). "Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene." Rna **11**(8): 1245-57.

Houbaviy, H. B., M. F. Murray, et al. (2003). "Embryonic stem cell-specific MicroRNAs." Dev Cell **5**(2): 351-8.

Huangfu, D., K. Osafune, et al. (2008). "Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2." Nat Biotechnol **26**(11): 1269-75.

Jaks, V., M. Kasper, et al. "The hair follicle-a stem cell zoo." Exp Cell Res **316**(8): 1422-8.

James, D., H. S. Nam, et al. "Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFbeta inhibition is Id1 dependent." Nat Biotechnol **28**(2): 161-6.

Jensen, J., J. Hyllner, et al. (2009). "Human embryonic stem cell technologies and drug discovery." J Cell Physiol **219**(3): 513-9.

Kaji, K., K. Norrby, et al. (2009). "Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors." Nature **458**(7239): 771-5.

Kanellopoulou, C., S. A. Muljo, et al. (2005). "Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing." Genes Dev **19**(4): 489-501.

Kaufman, D. S. (2009). "Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells." Blood **114**(17): 3513-23.

Kaufman, D. S., E. T. Hanson, et al. (2001). "Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10716-21.

Kawasaki, H., K. Mizuseki, et al. (2000). "Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity." Neuron **28**(1): 31-40.

Kehat, I., A. Gepstein, et al. (2002). "High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction." Circ Res **91**(8): 659-61.

Kehat, I., D. Kenyagin-Karsenti, et al. (2001). "Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes." J Clin Invest **108**(3): 407-14.

Kerr, C. L., J. D. Gearhart, et al. (2006). "Embryonic germ cells: when germ cells become stem cells." Semin Reprod Med **24**(5): 304-13.

- Kerr, C. L., M. J. Shablott, et al. (2006). "Pluripotent stem cells from germ cells." Methods Enzymol **419**: 400-26.
- Kim, D., C. H. Kim, et al. (2009). "Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins." Cell Stem Cell **4**(6): 472-6.
- Kim, H. S., S. K. Oh, et al. (2005). "Methods for derivation of human embryonic stem cells." Stem Cells **23**(9): 1228-33.
- Kim, J. B., H. Zaehres, et al. (2009). "Generation of induced pluripotent stem cells from neural stem cells." Nat Protoc **4**(10): 1464-70.
- King, T. J. and R. Briggs (1955). "Changes In The Nuclei Of Differentiating Gastrula Cells, As Demonstrated By Nuclear Transplantation." Proc Natl Acad Sci U S A **41**(5): 321-5.
- Klimanskaya, I., Y. Chung, et al. (2006). "Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres." Nature **444**(7118): 481-5.
- Klimanskaya, I., Y. Chung, et al. (2007). "Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres." Nat Protoc **2**(8): 1963-72.
- Koch, P., T. Opitz, et al. (2009). "A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(9): 3225-30.
- Koivisto, H., M. Hyvarinen, et al. (2004). "Cultures of human embryonic stem cells: serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor." Reprod Biomed Online **9**(3): 330-7.
- Kola, I. and J. Landis (2004). "Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?" Nat Rev Drug Discov **3**(8): 711-5.
- Krek, A., D. Grun, et al. (2005). "Combinatorial microRNA target predictions." Nat Genet **37**(5): 495-500.
- Krichevsky, A. M., K. C. Sonntag, et al. (2006). "Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis." Stem Cells **24**(4): 857-64.
- Ku, M., R. P. Koche, et al. (2008). "Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains." PLoS Genet **4**(10): e1000242.
- Lee, G., S. M. Chambers, et al. "Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells." Nat Protoc **5**(4): 688-701.
- Lee, G., H. Kim, et al. (2007). "Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **25**(12): 1468-75.
- Lee, G., E. P. Papapetrou, et al. (2009). "Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs." Nature **461**(7262): 402-6.
- Lee, M. Y., H. W. Lim, et al. (2009). "Smad, PI3K/Akt, and Wnt-dependent signaling pathways are involved in BMP-4-induced ESC self-renewal." Stem Cells **27**(8): 1858-68.

Lefort, N., M. Feyeux, et al. (2009). "[A recurrent hotspot of genomic instability identified in human ES cells]." Med Sci (Paris) **25**(1): 99-101.

Lefort, N., M. Feyeux, et al. (2008). "Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21." Nat Biotechnol **26**(12): 1364-6.

Lefort, N., A. L. Perrier, et al. (2009). "Human embryonic stem cells and genomic instability." Regen Med **4**(6): 899-909.

Leschik, J., S. Stefanovic, et al. (2008). "Cardiac commitment of primate embryonic stem cells." Nat Protoc **3**(9): 1381-7.

Levenstein, M. E., T. E. Ludwig, et al. (2006). "Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal." Stem Cells **24**(3): 568-74.

Lewis, B. P., C. B. Burge, et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.

Li, H., Y. Liu, et al. (2006). "Transcriptome coexpression map of human embryonic stem cells." BMC Genomics **7**: 103.

Li, J., G. Wang, et al. (2007). "MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal." Differentiation **75**(4): 299-307.

Li, W. and S. Ding "Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming." Trends Pharmacol Sci **31**(1): 36-45.

Li, X., Y. Chen, et al. (2001). "Fibroblast growth factor signaling and basement membrane assembly are connected during epithelial morphogenesis of the embryoid body." J Cell Biol **153**(4): 811-22.

Li, X. J., Z. W. Du, et al. (2005). "Specification of motoneurons from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **23**(2): 215-21.

Liang, H., M. Matzkies, et al. "Human and murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes serve together as a valuable model for drug safety screening." Cell Physiol Biochem **25**(4-5): 459-66.

Lim, L. P., N. C. Lau, et al. (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." Nature **433**(7027): 769-73.

Lin, S. L., D. C. Chang, et al. "Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression." Nucleic Acids Res **39**(3): 1054-65.

Lindenbaum, M. H. and F. Grosveld (1990). "An in vitro globin gene switching model based on differentiated embryonic stem cells." Genes Dev **4**(12A): 2075-85.

Liu, Y., S. Shin, et al. (2006). "Genome wide profiling of human embryonic stem cells (hESCs), their derivatives and embryonal carcinoma cells to develop base profiles of U.S. Federal government approved hESC lines." BMC Dev Biol **6**: 20.

Ma, Y., A. Ramezani, et al. (2003). "High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors." Stem Cells **21**(1): 111-7.

- Maherali, N., R. Sridharan, et al. (2007). "Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution." Cell Stem Cell **1**(1): 55-70.
- Mahmood, A., L. Harkness, et al. "Enhanced differentiation of human embryonic stem cells to mesenchymal progenitors by inhibition of TGF-beta/Activin/Nodal signaling using SB-431542." J Bone Miner Res.
- Mallon, B. S., K. Y. Park, et al. (2006). "Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells." Int J Biochem Cell Biol **38**(7): 1063-75.
- Marson, A., S. S. Levine, et al. (2008). "Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells." Cell **134**(3): 521-33.
- Marteyn, A., Y. Maury, et al. "Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy." Cell Stem Cell **8**(4): 434-44.
- Martin, G. R. (1980). "Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis." Science **209**(4458): 768-76.
- Mateizel, I., A. De Becker, et al. (2008). "Efficient differentiation of human embryonic stem cells into a homogeneous population of osteoprogenitor-like cells." Reprod Biomed Online **16**(5): 741-53.
- Mateizel, I., N. De Temmerman, et al. (2006). "Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders." Hum Reprod **21**(2): 503-11.
- Matsui, T., D. Leung, et al. "Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET." Nature **464**(7290): 927-31.
- Maurer, J., B. Nelson, et al. (2008). "Contrasting expression of keratins in mouse and human embryonic stem cells." PLoS One **3**(10): e3451.
- Maury, Y., M. Gauthier, et al. "[Human pluripotent stem cells: opening key for pathological modeling]." Med Sci (Paris) **27**(4): 443-6.
- McLean, A. B., K. A. D'Amour, et al. (2007). "Activin efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed." Stem Cells **25**(1): 29-38.
- Meissner, A. and R. Jaenisch (2006). "Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts." Nature **439**(7073): 212-5.
- Menasche, P., O. Alfieri, et al. (2008). "The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation." Circulation **117**(9): 1189-200.
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa, et al. (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." Cell **113**(5): 631-42.
- Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2006). "Stem cells and their niches." Science **311**(5769): 1880-5.
- Murchison, E. P., J. F. Partridge, et al. (2005). "Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(34): 12135-40.

- Murry, C. E. and G. Keller (2008). "Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development." Cell **132**(4): 661-80.
- Nakagawa, M., M. Koyanagi, et al. (2008). "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts." Nat Biotechnol **26**(1): 101-6.
- Nakayama, M. (2009). "Cell Therapy Using Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Meets Next-Next Generation DNA Sequencing Technology." Curr Genomics **10**(5): 303-5.
- Newman, M. A. and S. M. Hammond "Emerging paradigms of regulated microRNA processing." Genes Dev **24**(11): 1086-92.
- Nichols, J., B. Zevnik, et al. (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell **95**(3): 379-91.
- Nissan, X., J. A. Denis, et al. "miR-203 modulates epithelial differentiation of human embryonic stem cells towards epidermal stratification." Dev Biol **356**(2): 506-15.
- Nissan, X., L. Larribere, et al. "Functional melanocytes derived from human pluripotent stem cells engraft into pluristratified epidermis." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(36): 14861-6.
- Niwa, H., J. Miyazaki, et al. (2000). "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells." Nat Genet **24**(4): 372-6.
- Norstrom, A., K. Akesson, et al. (2006). "Molecular and pharmacological properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes." Exp Biol Med (Maywood) **231**(11): 1753-62.
- O'Malley, J., K. Woltjen, et al. (2009). "New strategies to generate induced pluripotent stem cells." Curr Opin Biotechnol **20**(5): 516-21.
- Ohyama, M. (2007). "Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells." J Dermatol Sci **46**(2): 81-9.
- Okita, K. and S. Yamanaka (2006). "Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells." Curr Stem Cell Res Ther **1**(1): 103-11.
- Park, I. H., N. Arora, et al. (2008). "Disease-specific induced pluripotent stem cells." Cell **134**(5): 877-86.
- Park, J. H., S. J. Kim, et al. (2003). "Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line." Biol Reprod **69**(6): 2007-14.
- Patani, R., A. Compston, et al. (2009). "Activin/Nodal inhibition alone accelerates highly efficient neural conversion from human embryonic stem cells and imposes a caudal positional identity." PLoS One **4**(10): e7327.
- Patel, M. and S. Yang "Advances in Reprogramming Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells." Stem Cell Rev.
- Pera, M. F., J. Andrade, et al. (2004). "Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin." J Cell Sci **117**(Pt 7): 1269-80.

Perrier, A. L., V. Tabar, et al. (2004). "Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(34): 12543-8.

Peschanski, M. (2000). "[Treatment of neurodegenerative diseases]." Pathol Biol (Paris) **48**(4): 447-8.

Peschanski, M. (2001). "[10 years of substitution therapy for neurodegenerative diseases using fetal neuron grafts: a positive outcome but with questions for the future]." J Soc Biol **195**(1): 51-5.

Peschanski, M., P. Hantraye, et al. (2000). "[Therapeutic potential of fetal neuron grafts in neurodegenerative diseases]." Bull Acad Natl Med **184**(6): 1213-7; discussion 1218-20.

Peters, C., J. M. Cornish, et al. "Stem cell source and outcome after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children and adolescents with acute leukemia." Pediatr Clin North Am **57**(1): 27-46.

Pfeifer, A., M. Ikawa, et al. (2002). "Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2140-5.

Pickering, S. J., S. L. Minger, et al. (2005). "Generation of a human embryonic stem cell line encoding the cystic fibrosis mutation deltaF508, using preimplantation genetic diagnosis." Reprod Biomed Online **10**(3): 390-7.

Puceat, M. (2008). "Protocols for cardiac differentiation of embryonic stem cells." Methods **45**(2): 168-71.

Rajala, K., H. Hakala, et al. (2007). "Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures." Hum Reprod **22**(5): 1231-8.

Rao, M. (2004). "Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells." Dev Biol **275**(2): 269-86.

Relaix, F. and C. Marcelle (2009). "Muscle stem cells." Curr Opin Cell Biol **21**(6): 748-53.

Ren, X. (2006). "Comments on control of developmental regulators by polycomb in human embryonic stem cells." Med Hypotheses **67**(6): 1469-70.

Reppel, M., F. Pillekamp, et al. (2005). "The electrocardiogram of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes." J Electrocardiol **38**(4 Suppl): 166-70.

Reubinoff, B. E., P. Itsykson, et al. (2001). "Neural progenitors from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **19**(12): 1134-40.

Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-11.

Richards, M., C. Y. Fong, et al. (2002). "Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells." Nat Biotechnol **20**(9): 933-6.

Rochon, C., V. Frouin, et al. (2006). "Comparison of gene expression pattern in SP cell populations from four tissues to define common "stemness functions"." Exp Cell Res **312**(11): 2074-82.

- Rodda, D. J., J. L. Chew, et al. (2005). "Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2." J Biol Chem **280**(26): 24731-7.
- Rodriguez, R. T., J. M. Velkey, et al. (2007). "Manipulation of OCT4 levels in human embryonic stem cells results in induction of differential cell types." Exp Biol Med (Maywood) **232**(10): 1368-80.
- Rosler, E. S., G. J. Fisk, et al. (2004). "Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions." Dev Dyn **229**(2): 259-74.
- Ruthenburg, A. J., C. D. Allis, et al. (2007). "Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark." Mol Cell **25**(1): 15-30.
- Sato, N., L. Meijer, et al. (2004). "Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor." Nat Med **10**(1): 55-63.
- Sato, N., I. M. Sanjuan, et al. (2003). "Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse." Dev Biol **260**(2): 404-13.
- Schickel, R., B. Boyerinas, et al. (2008). "MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death." Oncogene **27**(45): 5959-74.
- Scott, C. T., J. B. McCormick, et al. "Democracy derived? New trajectories in pluripotent stem cell research." Cell **145**(6): 820-6.
- Seki, T., S. Yuasa, et al. "Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells." Cell Stem Cell **7**(1): 11-4.
- Shamblott, M. J., J. Axelman, et al. (1998). "Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13726-31.
- Shi, Y. "Generation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells in vitro." Methods Mol Biol **636**: 79-85.
- Shilatifard, A. (2008). "Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation." Curr Opin Cell Biol **20**(3): 341-8.
- Sidhu, K. S. "New approaches for the generation of induced pluripotent stem cells." Expert Opin Biol Ther **11**(5): 569-79.
- Silva, J., O. Barrandon, et al. (2008). "Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition." PLoS Biol **6**(10): e253.
- Siomi, H. and M. C. Siomi "Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals." Mol Cell **38**(3): 323-32.
- Smith, A. "'No' to ban on stem-cell patents." Nature **472**(7344): 418.
- Smith, J. R., L. Vallier, et al. (2008). "Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm." Dev Biol **313**(1): 107-17.

- Snir, M., I. Kehat, et al. (2003). "Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(6): H2355-63.
- Soderdahl, T., B. Kupperts-Munther, et al. (2007). "Glutathione transferases in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells." Toxicol In Vitro **21**(5): 929-37.
- Soldner, F., D. Hockemeyer, et al. (2009). "Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors." Cell **136**(5): 964-77.
- Squazzo, S. L., H. O'Geen, et al. (2006). "Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner." Genome Res **16**(7): 890-900.
- Stacey, G. N., F. Cobo, et al. (2006). "The development of 'feeder' cells for the preparation of clinical grade hES cell lines: challenges and solutions." J Biotechnol **125**(4): 583-8.
- Stadtfeld, M., E. Apostolou, et al. "Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells." Nature **465**(7295): 175-81.
- Stadtfeld, M. and K. Hochedlinger "Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications." Genes Dev **24**(20): 2239-63.
- Stadtfeld, M., M. Nagaya, et al. (2008). "Induced pluripotent stem cells generated without viral integration." Science **322**(5903): 945-9.
- Stefanovic, S., N. Abboud, et al. (2009). "Interplay of Oct4 with Sox2 and Sox17: a molecular switch from stem cell pluripotency to specifying a cardiac fate." J Cell Biol **186**(5): 665-73.
- Stephenson, E. L., C. Mason, et al. (2009). "Preimplantation genetic diagnosis as a source of human embryonic stem cells for disease research and drug discovery." Bjog **116**(2): 158-65.
- Stojkovic, P., M. Lako, et al. (2005). "An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells." Stem Cells **23**(3): 306-14.
- Strelchenko, N., O. Verlinsky, et al. (2004). "Morula-derived human embryonic stem cells." Reprod Biomed Online **9**(6): 623-9.
- Suh, M. R., Y. Lee, et al. (2004). "Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs." Dev Biol **270**(2): 488-98.
- Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-72.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-76.
- Tenzen, T., F. Zembowicz, et al. "Genome modification in human embryonic stem cells." J Cell Physiol **222**(2): 278-81.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-7.

Thomson, J. A., J. Kalishman, et al. (1995). "Isolation of a primate embryonic stem cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7844-8.

Toh, W. S., E. H. Lee, et al. "In vitro derivation of chondrogenic cells from human embryonic stem cells." Methods Mol Biol **584**: 317-31.

Tsai, Z. Y., S. Singh, et al. "Identification of microRNAs regulated by activin A in human embryonic stem cells." J Cell Biochem **109**(1): 93-102.

Urbach, A. and N. Benvenisty (2009). "Studying early lethality of 45,XO (Turner's syndrome) embryos using human embryonic stem cells." PLoS One **4**(1): e4175.

Valdimarsdottir, G. and C. Mummery (2005). "Functions of the TGFbeta superfamily in human embryonic stem cells." Apmis **113**(11-12): 773-89.

Vallier, L., M. Alexander, et al. (2005). "Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells." J Cell Sci **118**(Pt 19): 4495-509.

Verlinsky, Y., N. Strelchenko, et al. (2005). "Human embryonic stem cell lines with genetic disorders." Reprod Biomed Online **10**(1): 105-10.

Vidarsson, H., J. Hyllner, et al. "Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes for in vitro and in vivo applications." Stem Cell Rev **6**(1): 108-20.

Vo, E., D. Hanjaya-Putra, et al. "Smooth-Muscle-Like Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells Support and Augment Cord-Like Structures In Vitro." Stem Cell Rev.

Wang, G., H. Zhang, et al. (2005). "Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers." Biochem Biophys Res Commun **330**(3): 934-42.

Warren, L., P. D. Manos, et al. "Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA." Cell Stem Cell **7**(5): 618-30.

Watkins, P. B. "Drug safety sciences and the bottleneck in drug development." Clin Pharmacol Ther **89**(6): 788-90.

Weinrich, S. L., R. Pruzan, et al. (1997). "Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT." Nat Genet **17**(4): 498-502.

Xiao, L., X. Yuan, et al. (2006). "Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells." Stem Cells **24**(6): 1476-86.

Xu, C., M. S. Inokuma, et al. (2001). "Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **19**(10): 971-4.

Xu, C., E. Rosler, et al. (2005). "Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium." Stem Cells **23**(3): 315-23.

Yang, C., W. Di, et al. "[Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider, Jack W. Szostak]." Yi Chuan **32**(1): 1-3.

- Yang, L., M. H. Soonpaa, et al. (2008). "Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population." Nature **453**(7194): 524-8.
- Yu, J., K. Hu, et al. (2009). "Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences." Science **324**(5928): 797-801.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, et al. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science **318**(5858): 1917-20.
- Yuan, X., W. Li, et al. "Small molecules in cellular reprogramming and differentiation." Prog Drug Res **67**: 253-66.
- Yusa, K., R. Rad, et al. (2009). "Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon." Nat Methods **6**(5): 363-9.
- Zeng, X. and M. S. Rao (2007). "Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement." Neuroscience **145**(4): 1348-58.
- Zhang, D., W. Jiang, et al. (2009). "Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells." Cell Res **19**(4): 429-38.
- Zhang, S. C., M. Wernig, et al. (2001). "In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **19**(12): 1129-33.
- Zheng, J. K., Y. Wang, et al. (2006). "Skeletal myogenesis by human embryonic stem cells." Cell Res **16**(8): 713-22.
- Zhong, X., N. Li, et al. "Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells." J Biol Chem **285**(53): 41961-71.
- Zhou, H. and S. Ding "Evolution of induced pluripotent stem cell technology." Curr Opin Hematol **17**(4): 276-80.
- Zhou, H., S. Wu, et al. (2009). "Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins." Cell Stem Cell **4**(5): 381-4.
- Zhou, T., C. Benda, et al. "Generation of induced pluripotent stem cells from urine." J Am Soc Nephrol **22**(7): 1221-8.
- Zwaka, T. P. and J. A. Thomson (2003). "Homologous recombination in human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **21**(3): 319-21.