

Cellules souches : ontogénie, caractéristiques, intérêt thérapeutique en pathologie tissulaire

Bernard David

▶ **To cite this version:**

Bernard David. Cellules souches : ontogénie, caractéristiques, intérêt thérapeutique en pathologie tissulaire. 38e journée du GAICRM-Groupement d'allergologie et d'immunologie clinique du Rhône Moyen, Mar 2015, Rochegude, France. pasteur-01348136

HAL Id: pasteur-01348136

https://pasteur.hal.science/pasteur-01348136

Submitted on 22 Jul 2016

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

38e journée du GAICRM
Symposium du 28 mars 2015
Rochegude

Cellules souches : ontogénie, caractéristiques intérêt thérapeutique en pathologie tissulaire

Professeur Bernard DAVID

Institut Pasteur

Les cellules souches sont issues soit de l'embryon, soit du fœtus, soit de tissus adultes avec ou sans transformation et peuvent aussi être obtenues par transfert de noyau. La cellule souche primitive est une **cellule indifférenciée**, capable de s'autorenouveler**,** de se différencier en d'autres types cellulaires et de proliférer en culture. C'est une cellule qui conserve ses capacités de prolifération pendant toute la vie de l'individu. Il en de même pour l'**autorenouvellemen**t qui se prolonge pendant des périodes indéfinies. Toutes les cellules souches ont la capacité de se différencier mais à différents degrés: c'est pourquoi on les classe en toti/pluri/multi/unipotentes (du latin **potens**, puissant, capable d'action**)**. (***Fig.1, 2,3***)

Cellules totipotentes

Les cellules embryonnaires ES (*Embryonic Stem Cells***)** totipotentes sont issues des premières divisions de l'œuf fécondé jusqu'au 4° jour**,** capables de donner naissance à tous les types de cellules de l'organisme et *les seules à permettre le développement complet d'un individu.* Les premières divisions donnent des blastomères (d'abord 2, puis 4, etc.) et à partir d'une douzaine de blastomères la cellule-œuf prend la forme d'une petite mûre, appelée ***morula*** (à partir de **16** cellules dans laquelle les cellules sont seulement juxtaposées, indépendantes les unes des autres et génère le ***blastocyst***e qui se développe dès le 4°jour.Il va constituer une masse interne (bouton embryonnaire) au cours de la segmentation comportant entre 70 et 100 cellules non identiques : macromères et micromères. Les premiers blastomères sont totipotents, comme le zygote mais cette totipotence s'amenuise progressivement à partir du stade morula pour devenir pluripotentes au 7°jour. Les seules vraies cellules totipotentes sont donc l'œuf fécondé et les cellules filles issues de ses toutes premières divisions.

Cellules pluripotentes

Les cellules embryonnaires ES pluripotentes sont les cellules filles des cellules totipotentes et sont issues la masse interne de l'embryon au stade blastocyste 40 du 5° au 7° jour. Elles ont déjà subi une première étape de différenciation, puisque les cellules de la masse interne se sont différenciées des cellules du trophectoderme (ou trophoblaste à l'origine du placenta); elles peuvent générer les cellules des trois lignées germinales (feuillets endodermique, mésodermique, et ectodermique) et donner naissance à plus de 200 types cellulaires représentatifs de tous les tissus de l'organisme. Une fois le blastocyste dissocié, les cellules ES qui en sont extraites ont perdu toute possibilité de se développer ultérieurement en un embryon; cependant, elles *peuvent être cultivées au laboratoire à l'infini* tout en conservant leur caractère de "pluripotence" et en *gardant un génome intact*. Il est donc possible d'obtenir des millions de cellules ES pluripotentes à partir d'un petit nombre de cellules embryonnaires de blastocyste. Placées dans des conditions de culture précises, ces cellules ont *également la capacité de se différencier en des cellules spécialisées* correspondant à tous les tissus de l'organisme (*cœur, sang, neurones,*.....).

Cellules multipotentes

Les cellules souches multipotentes peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules, mais elles sont déjà engagées dans une certaine direction. Il existe deux catégories de cellules multipotentes : les cellules souches fœtales et les cellules souches adultes.

Les souches fœtales apparaissent à un stade plus tardif (fœtus de 5-9 semaines) et sont utilisées à partir de tissus fœtaux isolés d'un fœtus résultant d'avortement. Comme les tissus adultes, les tissus fœtaux contiennent des cellules souches: toutefois, les tissus fœtaux contiennent des quantités proportionnellement plus importantes de cellules souches. A l'inverse des cellules ES, les cellules souches fœtales sont déjà engagées dans un programme de différenciation.

Les cellules souches adultes se trouvent, chez l'individu après la naissance, dans la plupart des tissus humains mais leurs potentialités sont plus restreintes que celles des cellules ES Leur rôle est essentiel : celui de réparer et de régénérer. Une cellule souche tissulaire somatique assure ***l'homéostasie***, c'est-à-dire le maintien physiologique d'un organe ou d'un tissu, en remplaçant les cellules mortes, que ce soit naturellement ou après une lésion, assurant ainsi la pérennité de la fonction de l'organe pendant la vie de l'individu. Elle remplit cette fonction, d'une part en se *multipliant à l'identique* (ce qui évite le tarissement du réservoir de cellules souches), d'autre part en *se différenciant*, acquérant ainsi les caractéristiques du tissu à réparer. Les cellules souches multipotentes peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules, mais elles sont déjà engagées dans une certaine direction. On dit que ce sont des cellules déterminées. Les cellules souches adultes du sang, de la peau, des intestins fonctionnent en permanence, pendant toute la vie. Malheureusement, d'autres organes, comme le cœur et le pancréas, ne renferment pas de cellules souches adultes et n'ont donc aucune possibilité de régénération en cas de lésion.

Cellules unipotentes

Seules, les cellules adultes sont unipotentes en mesure de ne fournir qu'un *seul type cellulaire* (foie, peau, cerveau etc.), mais capables d'auto régénération, ce qui les distingue des cellules précurseurs ;

Les cellules souches pluripotentes induites (i PS)

Jusqu'à une période très récente, les cellules souches pluripotentes humaines étaient toutes d'origine embryonnaire. Or l'utilisation de ce type de cellules malgré leurs applications potentielles soulève des problèmes d'éthique. Durant l'année 2006, une alternative est apparue lorsque les chercheurs Japonais Yamanaka (Prix Nobel 2012) et Takahashi ont été capables de ***reprogrammer*** des fibroblastes fœtaux (*mouse embryonic fibroblasts*, MEF) et adultes de souris en ***cellules pluripotentes.*** Via des agents viraux, ces chercheurs ont introduit dans des fibroblastes de souris adultes *quatre facteurs de transcription* présents chez les cellules souches embryonnaires, à savoir Oct3/4, Sox2, KLF4, et c-Myc. Ils montrèrent que l'introduction de ces facteurs de transcription provoque une dédifférenciation des cellules vers l'état pluripotent caractéristique du stade embryonnaire : la pluripotence induite était découverte. Il n'a ensuite fallu que quelques mois pour que soit annoncée, fin novembre 2007, la création de cellules iPS humaines par l'équipe de S. Yamanaka et celle de Thompson ***à partir de fibroblastes de peau prélevés sur un être humain.*** (***Fig.4***)

Cultures cellulaires

Les cellules souches embryonnaires (cellules ES) mises en culture sont celles qui proviennent de la Masse Cellulaire Interne ou « Inner Cell Mass (ICM) du blastocyste : elles sont pluripotentes. La recherche sur les cellules souches embryonnaires a débuté dans les années 1970 lorsque les premières lignées de cellules souches ***embryonnaires carcinomales*** ou cellules EC furent extraites de tumeurs testiculaires de souris (Kahan and Ephrussi, 1970) (Jakob et al, 1973) appelées **tératocarcinomes.** Constituées de types cellulaires différenciés très variés, associés à des cellules souches pluripotentes, ces cellules sont capables de s'autorenouveler mais aussi de se différencier dans un très grand nombre de types cellulaires. De nombreuses études ont montré que les cellules EC présentaient de nombreux points communs avec les cellules ES pluripotentes de l'ICM. La caractérisation des cellules EC *in vitro*, et notamment de leurs conditions de culture, a abouti en **1981** à l'isolement des premières lignées de cellules souches embryonnaires de souris mises en culture sur une matrice nourricière constituée de fibroblastes embryonnaires de souris (Evans and Kaufman,). En effet, la coculture des cellules pluripotentes EC avec des fibroblastes a permis le maintien de leur ***pluripotence.*** Depuis, de nombreuses lignées de cellules ES ont pu être isolées à partir d'autres espèces en utilisant la même technique que pour les embryons de souris. En **1998**, Thomson et ses collègues ont isolé la première lignée de cellules ES humaines, permettant ainsi l'espoir de les utiliser en thérapie cellulaire.

Travaux expérimentaux

1 Cellules embryonnaires et système nerveux

Parmi les expérimentations initiées depuis plus de 20 ans, la différenciation des cellules ES de souris et des cellules hES humaines en cellules du système nerveux, puis leur implantation dans le cerveau de l'animal, ont fait l'objet de nombreux travaux.

a - Chez l'animal

In vitro, les cellules ES sont capables d'évoluer vers tous les lignages et de donner naissance à des descendants très différenciés comme des oligodendrocytes synthétisant la myéline des cellules pancréatiques produisant de l'insuline ou des cardiomyocytes contractiles Les cellules ES sont également immortelles: placées dans des conditions appropriées, elles s'autorenouvellent de façon illimitée, sans modification de leur caryotype. Le facteur clé de cet autorenouvellement est le LIF (*leukemia inhibitory factor*), qui active une voie de signalisation inhibant la différenciation.

L'analyse de la différenciation des cellules ES dans les lignées gliales et neuronales du système nerveux a été particulièrement bien étudiée Les cellules ES se différencient spontanément en cellules exprimant des marqueurs du neuro-épithélium lorsqu'elles sont privées des facteurs permettant leur auto-renouvellement (LIF ou cellules nourricières).Cette propension à la différenciation en cellules neuro-épithéliales pourrait également résulter de l'action autocrine du *facteur FGF4* (fibroblast growth factor 4), qui est un inducteur de la différenciation neurale naturellement exprimé dans les cellules ES de souris.
Plusieurs stratégies visant à orienter spécifiquement la différenciation des cellules ES en précurseurs neuraux (c'est-à-dire en cellules souches multipotentes à l'origine des neurones et des cellules gliales - astrocytes et oligodendrocytes) ont été élaborées. (***Fig. 5***). Selon les conditions de culture utilisant des produits différents (facteurs de transcription, facteurs de croissance, hormones et autres inducteurs ou inhibiteurs) des populations de cellules exprimant majoritairement des marqueurs neuro-épithéliaux (tels le neurofilament nestine ou

le gène panneural *sox-1)* ont pu être obtenues avec une grande diversité de sous-types neuronaux. (neurones à dopamine ou à sérotonine, neurones cholinergiques etc…). La différenciation des cellules ES en neurones dopaminergiques mésencéphaliques - neurones de la substance noire dont la dégénérescence caractérise la maladie de Parkinson - a fait l'objet d'études approfondies chez le rat. Ainsi le *facteur Shh,* en synergie avec le *facteur de croissance FGF8*, stimule la différenciation en neurones dopaminergiques, mais aussi en neurones sérotoninergiques. La capacité des cellules, produites in vitro à partir de cellules ES, de coloniser des tissus hôtes après transplantation puis à restaurer une fonction biologique défectueuse, a été évaluée récemment dans le contexte de trois approches thérapeutiques du système nerveux la réinnervation de cibles musculaires par les motoneurones spinaux, la remyélinisation axonale par les oligodendrocytes et la restauration de la neurotransmission dopaminergique striato-corticale. Tous les travaux examinant les résultats de greffes de cellules dérivées de cellules ES ont été réalisés chez des rongeurs. En conclusion, les greffes pratiquées sur ces animaux ont abouti selon trois approches expérimentales, à des résultats positifs évalués par des analyses électrophysiologiques, fonctionnelles et comportementales, selon les cas, 2 à 12 semaines après les greffes.

b - Chez l'homme

Caractérisé par une impressionnante diversité cellulaire et l'extrême complexité de ses réseaux neuronaux, le système nerveux central (SNC) se définit également par son incapacité quasi totale à se régénérer. La mobilisation de ces cellules souches neurales à des fins régénératives reste cependant extrêmement limitée. Dans ces conditions, de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à remplacer les neurones perdus ont récemment vu le jour. Combinant une connaissance grandissante des processus de neuro- genèse et de spécification neuronale aux découvertes plus récentes des mécanismes moléculaires et épigénétiques gouvernant l'identité cellulaire, les approches de programmation de cellules pluripotentes (cellules souches embryonnaires ou cellules pluripotentes induites) et de reprogrammation de cellules somatiques sont à présent en plein essor. C'est au tout début des années 2000 que la première différenciation
in vitro de motoneurones spinaux (MNS) à partir de cellules souches embryonnaires a été rapportée. Rapidement, les facteurs de transcription ont pris le relais des signaux extrinsèques pour programmer les cellules souches embryonnaires en divers types neuronaux. Dans le même temps, Kazutoshi Takahashi et Shinya Yamanaka découvraient la reprogrammation nucléaire, démontrant que l'expression forcée de combinaisons de facteurs de transcription suffisait à reprogrammer une cellule somatique, en l'occurrence un fibroblaste, en une cellule pluripotente induite (iPSC), Le concept de ***conversion directe/reprogrammation*** *dirigée* était né.

Dans leur ensemble, ces travaux pionniers ont permis d'envisager la génération de neurones à partir de cellules somatiques, par conversion/ reprogrammation directe. C'est en 2010 que l'équipe de Marius Wernig a rapporté l'obtention des premiers « ***neurones induits*** » à partir de fibroblastes en testant méthodiquement divers facteurs de transcription connus pour leur rôle neurogénique.(***Tableau 1***) Ces premiers travaux de programmation et reprogrammation orientées vers la génération de neurones in vitro ont démontré le rôle incomparable des facteurs de transcription dans l'établissement d'une identité cellulaire donnée, et permis d'identifier les meilleurs candidats à l'induction d'un phénotype neuronal à partir de cellules. Parmi les candidats potentiels à une reprogrammation in situ en neurones, les cellules gliales arrivent en tête de liste. Les glies (astrocytes, oligodendrocytes et microglies) représentent près de 90 % des cellules du SNC, et en peuplent toutes les structures. Depuis, les travaux de C. Heinrich et de Caroline Rouaux ont montré que l'utilisation sélective des facteurs de transcription neurogéniques Neurog2 d'une part et d'Ascl1 et/ou Dlx2 d'autre part, permet d'obtenir respectivement des neurones glutamatergiques ou GABAergiques fonctionnels,

présentant toutes les caractéristiques électrophysiologiques de neurones adultes, capables en particulier de recevoir et d'émettre des connexions synaptiques. Ces résultats ont été reproduits à partir d'astrocytes de jeunes rats en réponse à Neurog2. Cette équipe a également démontré que les péricytes humains peuvent également donner naissance à des neurones en réponse à Ascl1 et Sox2. Enfin, d'autres travaux ont élaboré les premiers exemples de conversion directe de cellules neurales en neurones in vivo : à savoir la régénération induite du SNC ou reprogrammation directe glie-neurone in situ, la reprogrammation directe des glies en conditions pathologiques *in vivo* et la conversion directe neurone-neurone, premières évidences *in vivo.* (***Fig.6***)
Donc toutes les stratégies ont conduit à une génération de neurones fonctionnels que ce soit à partir d'astrocytes, de cellules gliales NG2 et de péricytes, de cellules gliales réactionnelles in vivo (sous conditions traumatiques) ou neurodégénératives ou conversion directe de neurones.
Si le chemin vers l'application thérapeutique de la reprogrammation directe in situ appliquée au SNC semble encore long, des précédents existent déjà dans d'autres organes. Dans l'oreille interne, les cellules de soutien peuvent être converties en cellules ciliées et restaurer l'audition de cochons d'Inde sourds. Les cellules bêta du pancréas peuvent être régénérées chez la souris à partir de cellules exocrines et sécréter de l'insuline, corrigeant ainsi les symptômes du diabète. Dernièrement, c'est dans le cœur de souris que cette stratégie s'est révélée gagnante, avec la reprogrammation directe de fibroblastes cardiaques en myocytes contractiles, améliorant les fonctions cardiaques suite à un infarctus.

2 Autres organes

Si le chemin vers l'application thérapeutique de la **reprogrammation directe** in situ appliquée au SNC semble encore long, des précédents existent déjà dans d'autres organes. Dans l'oreille interne, les cellules de soutien peuvent être converties en cellules ciliées et restaurer l'audition de cochons d'Inde sourds. Les cellules bêta du pancréas peuvent être régénérées chez la souris à partir de cellules exocrines et sécréter de l'insuline, corrigeant ainsi les symptômes du diabète. Dernièrement, c'est dans le cœur de souris que cette stratégie s'est révélée gagnante, avec la reprogrammation directe de fibroblastes cardiaques en myocytes contractiles, améliorant les fonctions cardiaques suite à un infarctus. Très récemment, c'est la stratégie qu'a utilisée également l'équipe japonaise de M. Takahashi en différenciant en culture des *iPS en cellules rétiniennes,* pou**r** soigner une patiente atteinte de dégénérescence maculaire (***DMLA***).

A. Cellules hépatiques

Dans le cadre d'un projet mené par des équipes anglaises et françaises, des chercheurs montrent pour la première fois que des cellules iPS produites à partir de cellules de patients atteints d'une maladie du foie, peuvent être génétiquement corrigées puis différenciées en ***cellules hépatiques*** pour participer à une régénération du foie dans un modèle animal. Ces travaux, publiés en 2011 dans la revue ***Nature*****,** constituent une preuve de concept majeure pour envisager le recours futur à ces cellules souches chez l'Homme, en vue d'une thérapie génique. Les cellules iPS constituent une base potentielle à l'exploration de nombreux domaines thérapeutiques, notamment celui des greffes ou de la thérapie génique. Pour autant, les travaux menés sur ces cellules n'avaient pas à ce jour apporté de preuve de leur efficacité potentielle in vivo pour de telles utilisations.

Les chercheurs du Sanger Institute et de l'université de Cambridge (Royaume-Uni), avec la collaboration d'une équipe française Institut Pasteur/Inserm, viennent pour la première fois de démontrer que les cellules dérivées de cellules souches iPS peuvent être utilisées dans le cadre d'une thérapie génique pour contribuer à pallier les effets d'une pathologie dans un modèle de souris portant une insuffisance hépatique. Les chercheurs ont travaillé sur une maladie génétique rare qui affecte le foie. Elle est due à une mutation ponctuelle dans le ***gène de l'enzyme alpha-1-antitrypsine***, essentielle au bon fonctionnement des cellules hépatiques. Chez l'enfant, elle se manifeste par des symptômes plus ou moins bénins (jaunisse, distension de l'abdomen…), mais peut évoluer progressivement chez l'adulte vers une cirrhose, contre laquelle le seul espoir de guérison est une transplantation de foie.

Les chercheurs de l'université de Cambridge, (Ludovic Vallier et David Lomas,) et du Sanger Institute, (Allan Bradley) ont dans un premier temps prélevé des *cellules de la peau de patients*, et les ont mis en culture in vitro afin de les « dédifférencier » et de leur conférer les propriétés de cellules souches pluripotentes : c'est le stade « cellules iPS ». Les scientifiques sont alors parvenus, par génie génétique, à corriger dans ces cellules la mutation responsable de la maladie. Ils ont ensuite engagé ces cellules souches devenues « saines » dans la voie de maturation les conduisant à se différencier en cellules du foie. Les scientifiques d'une unité mixte Institut Pasteur/ Inserm, conduite par James Di Santo avec Hélène Strick-Marchand ont alors testé les nouvelles cellules hépatiques humaines ainsi produites sur un modèle animal atteint d'insuffisance hépatique. Leur travail a montré qu'elles étaient d'une part parfaitement fonctionnelles et aptes à s'intégrer dans le tissu existant, et d'autre part qu'elles contribuaient à la régénération du foie chez les souris traitées. Ces travaux pionniers, publiés dans Nature, renforcent ainsi les espoirs des communautés scientifiques et médicales dans le recours aux cellules iPS à des fins thérapeutiques chez l'Homme.

B. Cellules pulmonaires

.Dans la revue des maladies respiratoires en 2003, E Lemarié faisait observer que « depuis l'année 2000, les travaux s'étaient multipliés sur les cellules souches : 1 600 publications référencées dans *Pubmed* ; quatre essais cliniques en cours dans l'insuffisance cardiaque chronique, l'ostéogenèse et le syndrome de Hurler. Au congrès de l'ATS 2002, une seule présentation portait sur ce sujet et 2003, trois symposiums furent consacrés à ce thème ». Plusieurs communications de l'ATS avaient pour objectif d'identifier les types cellulaires qu'elles étaient potentiellement capables de régénérer, mais que la difficulté de l'appareil respiratoire résidait dans le fait qu'il est constitué de cellules multiples : épithélium bronchique, cellules de Clara, pneumocytes I et II…. Les premiers travaux se sont orientés sur la capacité des cellules souches circulantes d'origine médullaire à remplacer des cellules lésées dans le poumon. Des cellules souches médullaires de souris exprimant le gène GFP *(green fluorescent protein)* fluorophore ont été isolées (GFP+), puis ont été réinjectées à des souris irradiées. Six mois plus tard, les poumons analysés pour identifier les cellules GFP+ par microscopie en fluorescence ont visualisé l'expression GFP+ dans des cellules épithéliales alvéolaires (cytokératine+), des cellules bronchiolaires, et des pneumocytes I et II.

D'autres travaux ont confirmé plus ou moins ces résultats et il fallut attendre 2010 pour que les scientifiques réussissent à créer un poumon à partir de cellules souches embryonnaires de souris. Dans cette étude, ils avaient détruit les cellules d'un poumon de rat par plusieurs cycles de congélation-décongélation puis utilisé cette carcasse pulmonaire comme support pour faire croître de nouvelles cellules. Enfin, c'est en 2014 qu'un stade supérieur a été atteint par des chercheurs de l'Université du Texas qui ont tenté d'appliquer cette technique à

l'Homme en utilisant les poumons de deux adolescents décédés à la suite d'un accident. Ils ont tout d'abord détaché les cellules pulmonaires de l'un d'eux par une technique identique à celle utilisée chez le rat. Des cellules saines ont ensuite été prélevées de l'autre poumon et placées sur ce squelette pulmonaire composé principalement d'élastine et de collagène. Le tout a alors été immergé dans une solution nutritive pendant quatre semaines. Au cours de cette période, les cellules se sont peu à peu développées jusqu'à former un poumon tout neuf. Pour vérifier l'efficacité de cette technique, les chercheurs l'ont reproduite une seconde fois avec succès. L'un des organes les plus délicats à reconstituer est probablement le poumon et , les transplantations de poumons sont souvent l'unique traitement possible pour soigner certaines maladies incurables comme la mucoviscidose. Ce travail prometteur ouvre la voie vers l'utilisation de poumons artificiels en vue d'une greffe. « Mais de nombreux travaux restent à faire, déclare le directeur de cette équipe .Il faudra probablement attendre plus de dix ans avant que les poumons artificiels voient le jour dans les salles d'opération. »

a) Expérimentation : ***J. Kajstura (N. Engl J Med 2011)***

Pour identifier et caractériser l'existence de cellules souches pulmonaires humaines in vitro sur des échantillons de tissus pulmonaires humains, Kajstura J et son équipe ont utilisé l'antigène c-kit comme marqueur immuno- histochimique. Les cellules souches recherchées (positives au C-kit) ont été localisées in situ puis cultivées in vitro. Après plusieurs semaines, des clones cellulaires exprimant le marqueur C-kit, pouvant se différencier en structures endodermiques (cellules épithéliales) et mésodermiques (vaisseaux) ont été obtenus. Ensuite, *in vivo* les cellules souches pulmonaires humaines ont été implantées dans le poumon de souris immunodéprimées après création d'une lésion à l'azote liquide de leur parenchyme pulmonaire pour tester leur capacité à générer un tissu pulmonaire pluri-composant organisé en structures fonctionnelles et à s'auto renouveler. Après quelques semaines, les cellules injectées avaient formé des bronchioles, alvéoles et vaisseaux pulmonaires humains structurellement et fonctionnellement intégrés au poumon lésé de la souris en restaurant le parenchyme. La détection de gènes humains dans les structures épithéliales et vasculaires néoformées, a confirmé la formation d'un "poumon chimérique" : le parenchyme pulmonaire humain néoformé a remplacé plus de 30% du tissu pulmonaire de la souris lésé au départ. Les auteurs ont estimé qu'au niveau des bronchioles et des alvéoles, il existait respectivement une cellule souche pour 6000 cellules et une pour 30000 et que 79% des cellules souches humaines "nichaient" dans les bronchioles et 21% au niveau des alvéoles, leur nombre décroissant progressivement vers les voies aériennes plus larges. Le poumon humain possède donc un pool de cellules c-kit positives qui ont les propriétés fondamentales des cellules souches. Leur capacité à générer des bronchioles, alvéoles, vaisseaux humains est en faveur de leur rôle dans la régénération d'un tissu pulmonaire lésé.

b) Expérimentation : ***Sarah X L Huang, et al.(Nature Biotechnology,2013)***

Les travaux de recherche s' appuient sur la découverte par le Dr Hans-Willem Snoeck en (University de Columbia) en 2011 d'un ensemble de facteurs chimiques qui peuvent transformer les cellules souches embryonnaires humaines (ES) ou des cellules souches pluripotentes humaines induites (iPS) en cellules endodermiques précurseurs des cellules du poumon et des voies respiratoires Les cellules iPS humaines ressemblent fortement aux cellules souches embryonnaires humaines, mais sont générées à partir de **cellules de la peau**, en les stimulant lors d'une étape en amont de leur développement pour les différencier en cellules spécialisées. Ensuite, le Dr Snoeck et ses collègues ont trouvé de nouveaux facteurs susceptibles d'orienter la transformation des cellules humaines ES ou iPS en cellules

épithéliales pulmonaires fonctionnelles (cellules qui couvrent la surface du poumon Les cellules obtenues se sont révélées exprimer des marqueurs d'au moins six types de cellules épithéliales des voies aériennes et du poumon et en particulier les marqueurs sur des cellules épithéliales alvéolaires de type 2. (Fig. 7) Les cellules de type 2 sont importantes parce qu'elles produisent le surfactant, substance essentielle pour contrôler les alvéoles pulmonaires, où ont lieu les échanges gazeux et coordonner la respiration pulmonaire. Elles participent également à la réparation du poumon après des lésions tissulaire. Ces découvertes ont des implications dans l'étude d'un certain nombre de maladies pulmonaires, y compris la fibrose pulmonaire idiopathique (FIP), dans laquelle les cellules épithéliales alvéolaires de type 2 sont supposées jouer un rôle central. "Personne ne sait ce qui cause la maladie, et il n'y a aucun moyen de le traiter», explique le Dr Snoeck Grâce à cette technologie, les chercheurs vont enfin être en mesure de créer des modèles de l'IPF au laboratoire et d'étudier la maladie au niveau moléculaire afin de découvrir des médicaments adéquats pour les traitements futurs. A plus long terme, cette équipe espère utiliser cette technologie pour faire une greffe du poumon autologue en prenant le poumon d'un donneur et enlever toutes les cellules pulmonaires. Dans l'ossature vacante du poumon, il suffirait de réintroduire de nouvelles cellules de poumon provenant du patient. De cette façon, les problèmes de rejet pourraient être évités.

Applications biomédicales

La technique issue des cellules pluripotentes induites permet de fabriquer des cellules souches « à la carte » pour une médecine régénératrice. Même si le chemin vers l'application thérapeutique de la reprogrammation directe semble encore long, les travaux expérimentaux initiés au début du siècle ont connu un essor considérable depuis 2006. . L'une des premières preuves a été établie avec la maladie de Parkinson. Des chercheurs après avoir transplanté des CSPi dans le cerveau d'un modèle animal de la maladie de Parkinson, ont montré que ces cellules se sont différenciées en neurones dopaminergiques, avec une amélioration des symptômes de la maladie chez l'animal De même, une étude menée sur des modèles murins de lésion de la moelle épinière, montre que la transplantation de CSPi humaines stimule la régénération neuronale et améliore la locomotion. Dans l'oreille interne, les cellules de soutien peuvent être converties en cellules ciliées et restaurer l'audition de cochons d'Inde sourds. Les cellules bêta du pancréas peuvent être régénérées chez la souris à partir de cellules exocrines et sécréter de l'insuline, corrigeant ainsi les symptômes du diabète. Dernièrement, une transplantation de CSPi humaines dans le myocarde de souris ayant subi un infarctus aigu s'est traduit par une amélioration substantielle des fonctions cardiaques grâce à la reprogrammation directe de fibroblastes cardiaques en myocytes contractiles. Très récemment, c'est la stratégie qu'a utilisée également l'équipe japonaise de M. Takahashi en différenciant en culture des iPS en cellules rétiniennes, pour soigner une patiente atteinte de dégénérescence maculaire (DMLA). . Une autre application intéressante des CSPi réside dans le traitement des maladies génétiques. Par exemple, utilisant des souris chez laquelle la drépanocytose avait été induite, des chercheurs ont produit des CSPi chez lesquels ils ont corrigé l'anomalie génétique. Ces cellules différenciées en cellules souches hématopoïétiques (cellules précurseurs des cellules sanguines) ont été réintroduites dans les souris drépanocytaires, permettant une nette amélioration des symptômes chez ces dernières Les CSPi peuvent aussi être utilisées dans le cadre d'une médecine personnalisée. Par exemple il serait possible de générer des cellules hépatiques ou rénales qui serviront à faire des analyses

toxicologiques sur différents médicaments, afin de déterminer celui qui sera le plus tolérable pour chaque patient ce qui permettra au médecin de faire le meilleur choix dans l'éventail de médicaments disponibles pour traiter une pathologie donnée. Dans le cadre des anomalies dégénératives et génétiques, les CSPi peuvent être utilisées pour produire des cellules reproduisant la maladie in vitro, ce qui facilitera l'étude de la maladie et la réalisation de tests pharmacologiques afin d'établir le meilleur protocole thérapeutique adapté à chaque patient.

Conclusions

Les cellules souches pluripotentes induites peuvent être une source très intéressante de cellules pour une médecine régénératrice : amplification in vitro illimitée, possibilité de différenciation en n'importe quel type cellulaire. L'avantage de ces cellules iPS par rapport aux cellules hES est qu'elles soulèvent moins de problèmes éthiques. De plus, on peut établir des iPS à partir d'un individu dont on veut réparer un tissu ou un organe abîmé, ce qui permet en théorie d'éviter le rejet de la greffe cellulaire. L'inconvénient est que les gènes qui codent les facteurs de « reprogrammation » peuvent s'intégrer dans le génome des cellules iPS et y causer des dommages. De nombreuses équipes travaillent à surmonter cet obstacle, en particulier en n'introduisant pas dans les cellules les gènes mais les produits qui en découlent (ARN/protéines). De même, des scientifiques s'attèlent à mieux comprendre quels facteurs sont indispensables, au-delà du cocktail initial, pour orienter en culture une cellule souche dans une voie de différenciation donnée.

Remerciements à mon collègue le Pr Fabrice CHRETIEN Chef de l'Unité d'Histopathologie humaine et modèles animaux pour ses précieux conseils.

Références

A C Fluckiger, C Dehay, P Savatier. Cellules souches embryonnaires et thérapies cellulaires du système nerveux. *Médecine/Sciences 2003 ; 19 : 699-708*

Takahashi, K. et S. Yamanaka Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors *Cell 2006* ; 126(4):663-76.

Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors *Cell 2007*; 131(5):861-72.

E Kieffer, S Kuntz, S Viville. Tour d'horizon des lignées de cellules souches pluripotentes. *Médecine/Sciences 2010 ; 26 : 848-54*

J Kajstura et al. Evidence for Human Lung Stem Cells. *2011 N Engl J Med May 12,*

S X L Huang et al. Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. Sarah X L Huang, et al. *Nature Biotechnology 2014 ; 32 : 1 Jan*

C Heinrich, C Rouaux. Vers une régénération induite du système nerveux. *Médecine/Sciences 2015 ; 31 : 35-42*

ANNEXE

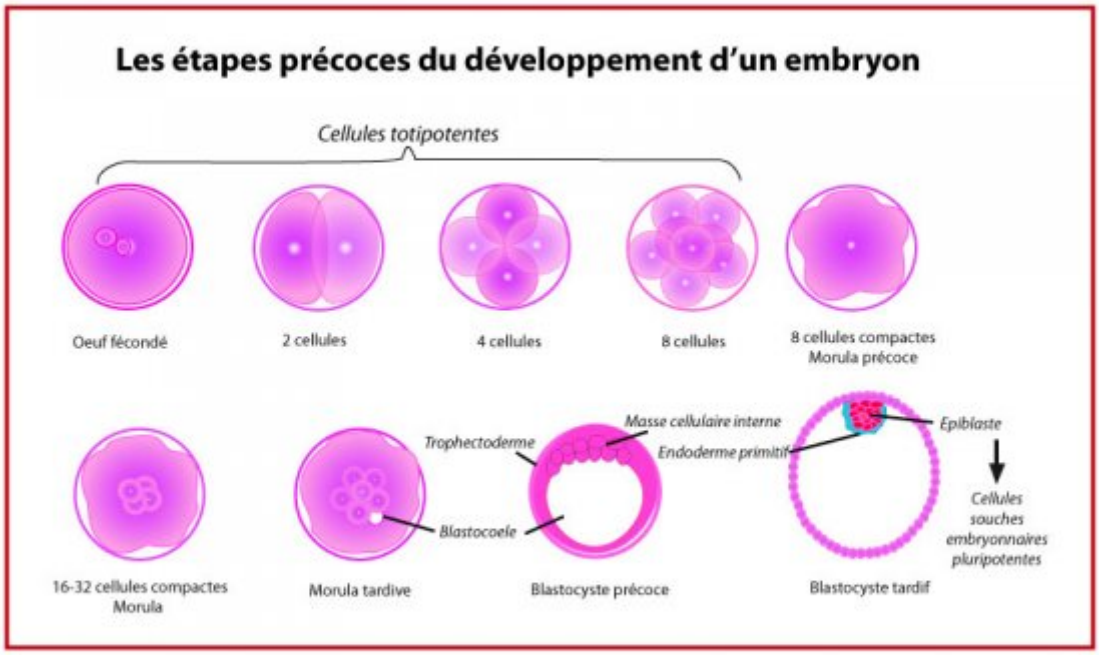
1 Culture des lignées cellulaires

Pour pouvoir isoler une cellule souche d'un tissu, il faut pouvoir l'identifier tout en la maintenant en vie. Or, ceci est loin d'être facile à réaliser. Plusieurs stratégies peuvent être utilisées dont l'une, par exemple est de manipuler les cellules souches dans des milieux appropriés à l'aide de facteurs de croissances ou de nouveaux gènes, pour déterminer quel genre de cellules différenciées on obtient. Ainsi, un consortium de chercheurs travaillant sur les cellules ES humaines à travers le monde s'est créé, «The International Stem Cell Initiative », afin de « standardiser» la caractérisation des lignées des cellules ES humaines. Pour l'étude des profils d'expression génique, sur 59 lignées de cellules ES provenant de 17 laboratoires à travers le monde, un profil des différentes cellules ES humaines a pu être dégagé avec la reconnaissance de marqueurs communs: 1) ***des facteurs de transcription:*** des facteurs de transcription: SOX2, Nanog, Oct-4 (aussi connu sous le nom de POU5F1) cruciaux pour le maintien de l'état indifférencié et de l'auto-renouvellement, mais aussi les protéines Wnt, etc. 2) ***des facteurs de croissance*** TDGFI, GDF3, le **LIF** (Leukemia Inhibitory Factor) et les BMPs nécessaires pour la culture des cellules souches pluripotentes de souris. En revanche, le **BFGF** est requis dans le milieu de culture pour le maintien de la pluripotence des cellules souches pluripotentes humaines, tandis que les BMPs induisent une perte de leur pluripotence (différenciation).etc..3) des ***marqueurs de surface*** relativement spécifiques des cellules pluripotentes (SSEA-3, TRA-l60, chez l'homme ou SSEA-l chez la souris) etc. De nouvelles conditions de culture facilitant l'autorenouvellement des cellules hES doivent être mises au point, avec la contrainte impérative de s'affranchir de l'utilisation de cellules nourricières ou de milieux conditionnés produits à partir d'autres espèces afin d'éliminer le risque de transmission interspécifique d'agents pathogènes. Des progrès doivent également être réalisés dans la maîtrise de la différenciation des cellules hES. En effet, la réponse de ces cellules à certains facteurs de croissance diffère de celle des cellules ES de souris, soulignant la nécessité de développer de nouvelles méthodes de différenciation spécifiques.

2 - Tératome ou tératocarcinome

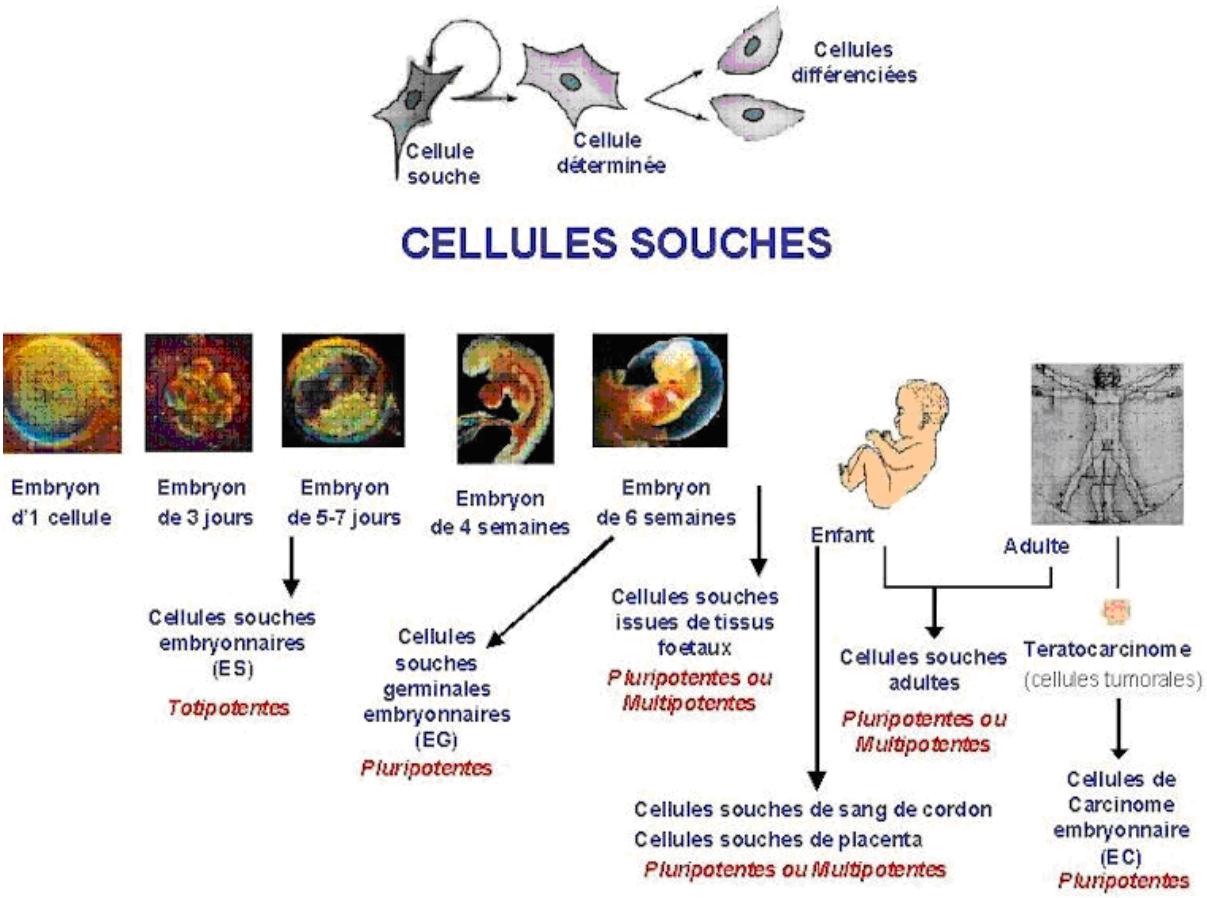
Un tératome est la formation d'une tumeur à partir de cellules pluripotentes toujours présentes dans le corps ou apportées par la greffe de cellules souches. La tumeur dérive d'un ou de plusieurs des trois types de feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) et peut être bénigne ou maligne. Ces tissus ne sont pas organisés comme dans un embryon normal, mais sont, séparément, parfaitement normaux. Ce sont précisément ces cellules capables de toutes différenciations qui ont attiré l'attention des biologistes à partir des années 1960. En effet, si les tératomes ont été décrits par les médecins vers 1890, leur étude expérimentale débute vers 1955 lorsque Leroy Stevens, chercheur au Jackson Laboratory dans le Maine (États-Unis), caractérise une souche de souris qui développe un tératocarcinome testiculaire à haute fréquence. La tumeur est transplantable de souris à souris et contient des cellules embryonnaires totipotentes. Ces cellules ont été isolées en Grande-Bretagne et en France (B. Ephrussi et F. Jacob), cultivées in vitro avec l'idée qu'elles serviront comme système modèle pour l'étude des étapes précoces du développement embryonnaire de la souris. Effectivement, les études expérimentales ultérieures ont montré que les cellules embryonnaires (EC ou *embryonal cells*), avaient de nombreuses propriétés en commun avec les cellules du tératome embryonnaire.

Figures 1 et 2



Le développement embryonnaire de la peau

les **cellules souches** de la biologiedelapeau.fr **Michel Démarchez**



.Timothy Caulfield, "From Human Genes to Stem Cells: New Challenges for Patent Law?" (2003) 21 *Trends in Biotechnology* 100-103

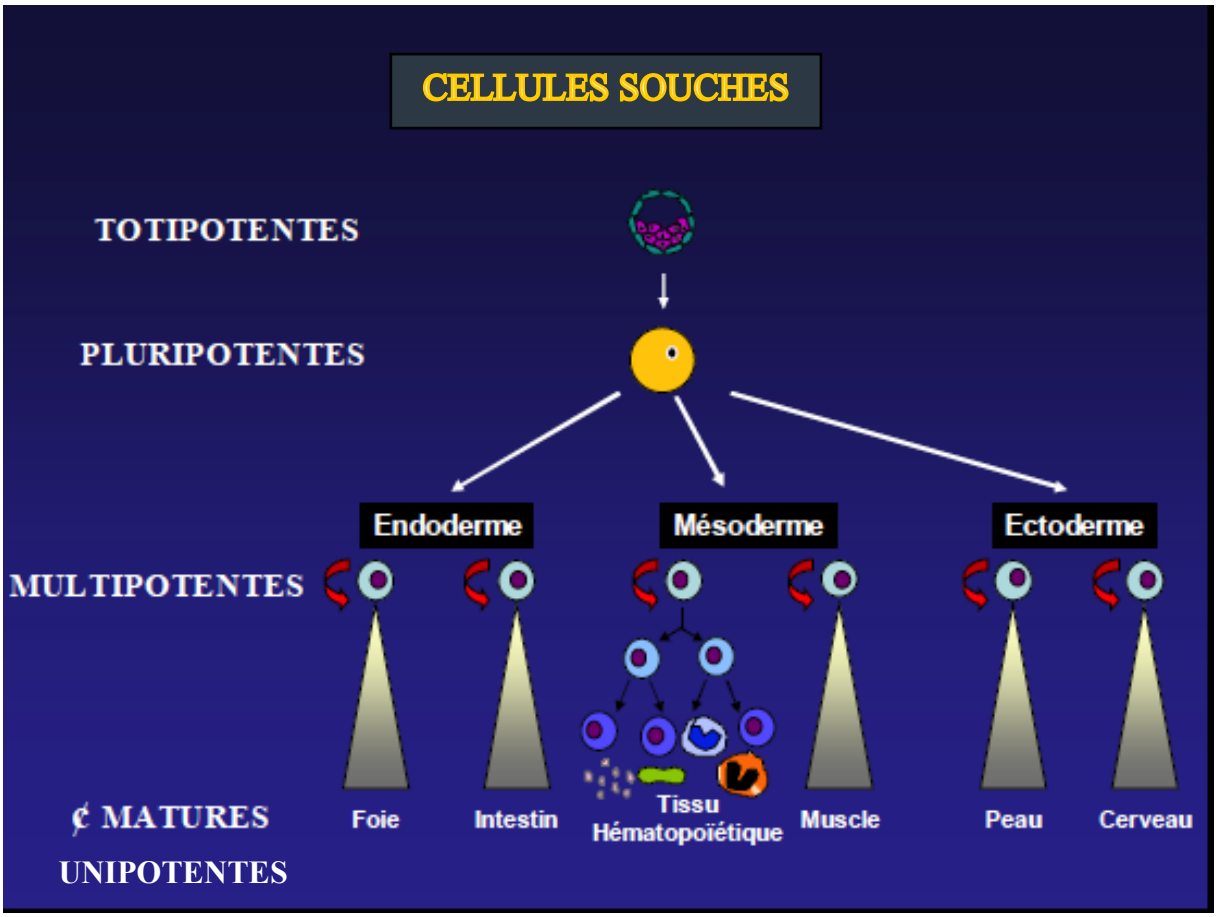
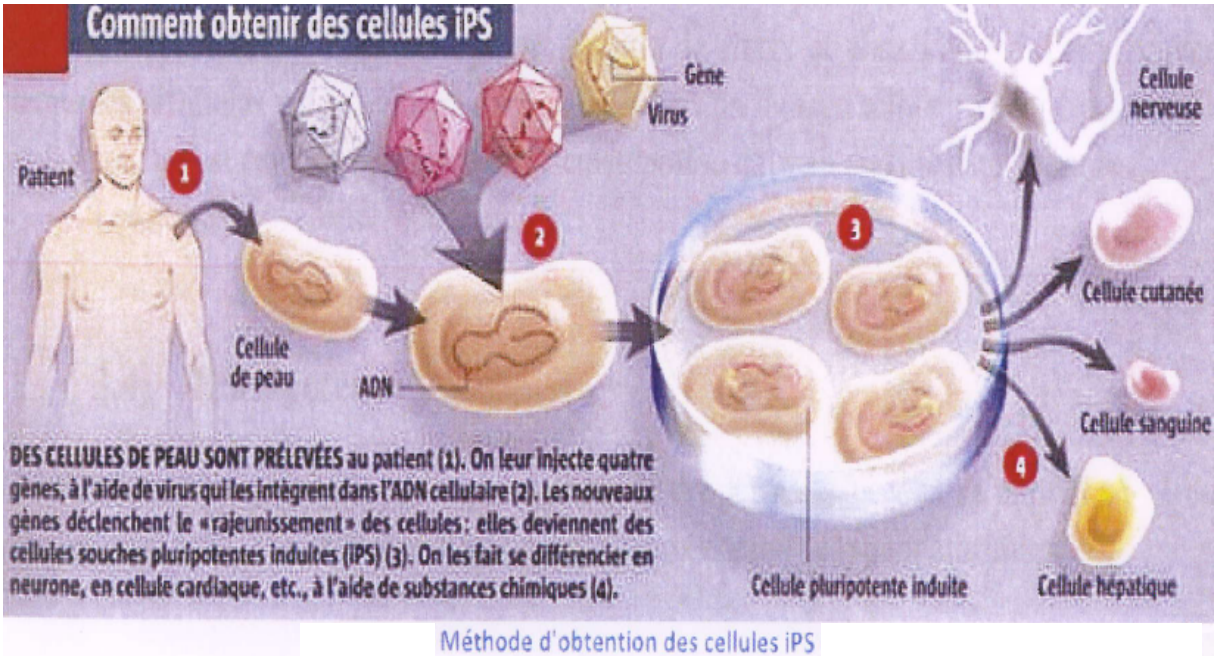


Fig.3 cellules souches *fac/biocell/diapos.cours.cellules.souches*



Méthode d'obtention des cellules iPS

Fig. 4 cellules iPS Cours-médecine.info les cellules souches 2009

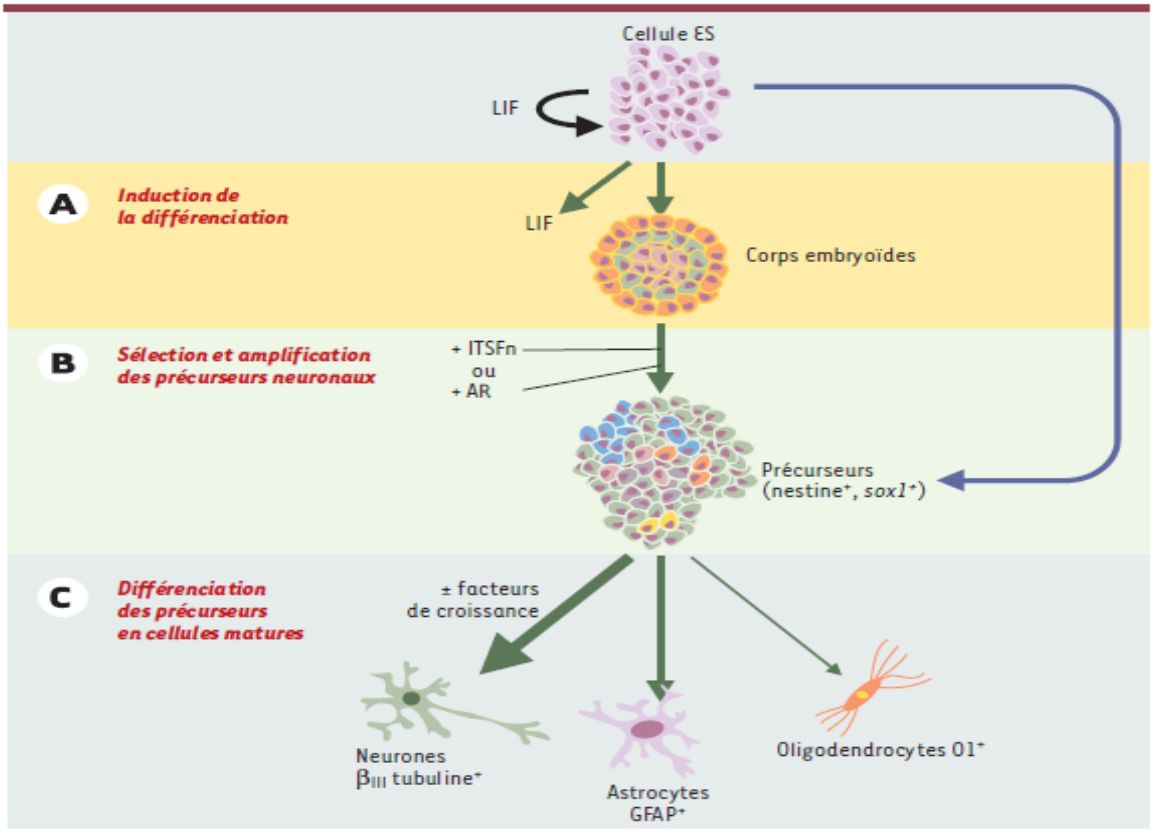


Fig 5 Principales étapes de la différenciation des cellules ES de souris en cellules du système nerveux. A C Fluckiger et coll *Médecine/Sciences 2003 n°6-7 vol.19*

Cellule d'origine	Facteurs de transcription	Phénotype des neurones induits	Références
Astrocyte murin	Pax6	Sans phénotype caractérisé	[26, 27]
	Neurog2	Glutamatergique	[28, 29, 31]
	Dlx2	GABAergique	[28, 29]
	Dlx2, Ascl1	GABAergique	[28, 29]
	Ascl1, Lmx1b, Nurr1	Dopaminergique	[32]
	NeuroD1	Glutamatergique	[33]
Astrocyte humain	NeuroD1	Glutamatergique	[33]
Cellules gliales NG2 murines	Neurog2	Glutamatergique	[31]
	NeuroD1	Glutamatergique et GABAergique	[33]
Péricyte humain	Ascl1, Sox2	GABAergique	[34]

Tableau.1 Conversion directe de cellules gliales et péricytes en neurones in vitro.

C Heinrich, C Rouaux. . *Médecine/Sciences 2015 n°1 vol.31*

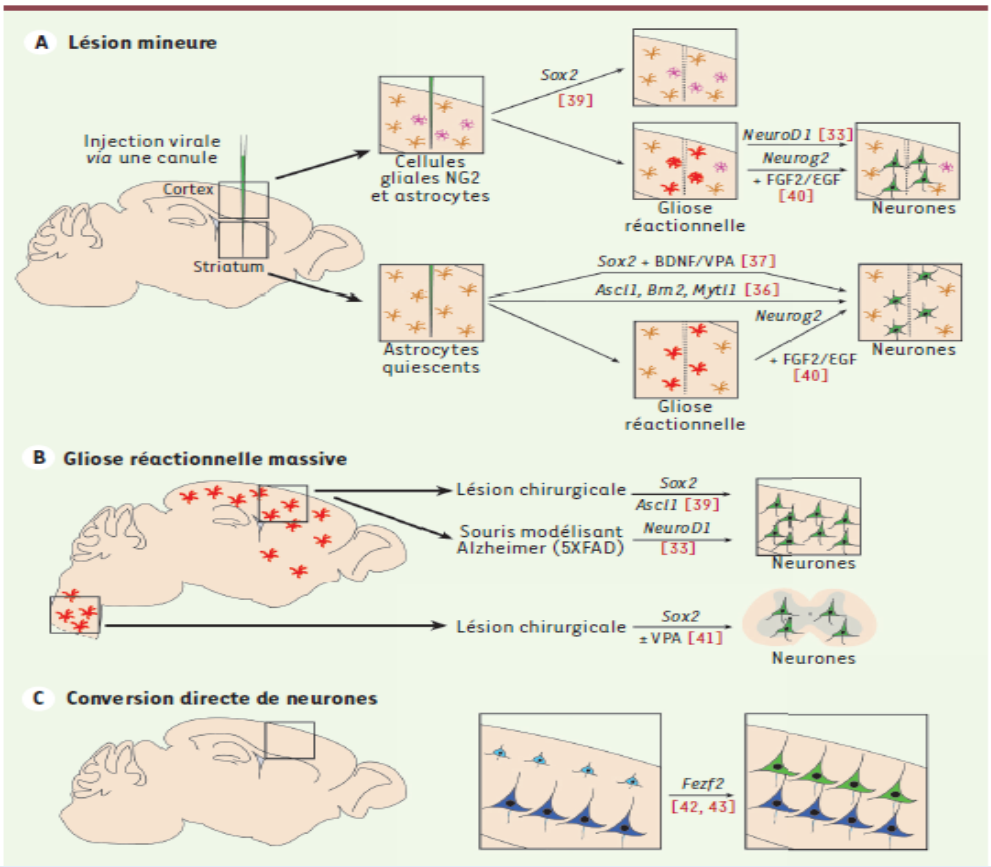


Fig.6 ***premiers exemples de conversion directe de cellules neurales en neurones*** in vivo

C Heinrich, C Rouaux. . *Médecine/Sciences 2015 n°1 vol.31*

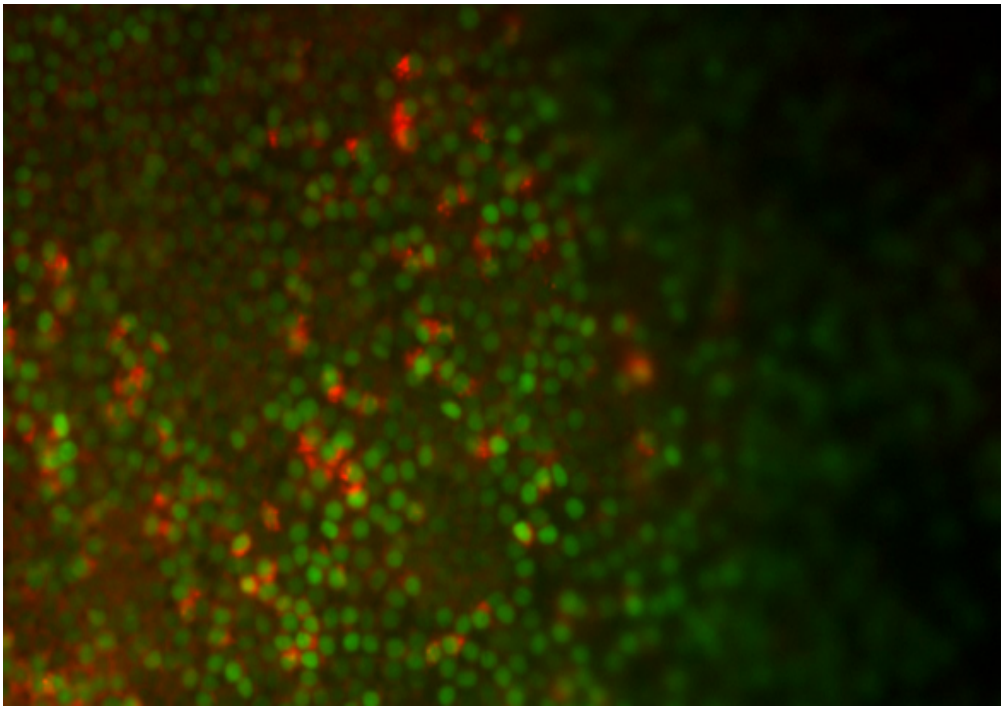


Fig. 7 Cellules souches embryonnaires humaines différenciées en cellules de type II épithéliales alvéolaires du poumon (vert). Une grande partie de ces cellules transformées expriment la protéine B tensioactive (rouge), ce qui indique qu'elles sont fonctionnelles (type II) Sarah X Huang ***Nature Biotechnology 2013***