

■ **EN DEUX MOTS** ■ Fin novembre 2007, deux équipes, l'une japonaise, l'autre américaine, présentent une nouvelle méthode d'obtention de cellules souches embryonnaires humaines.

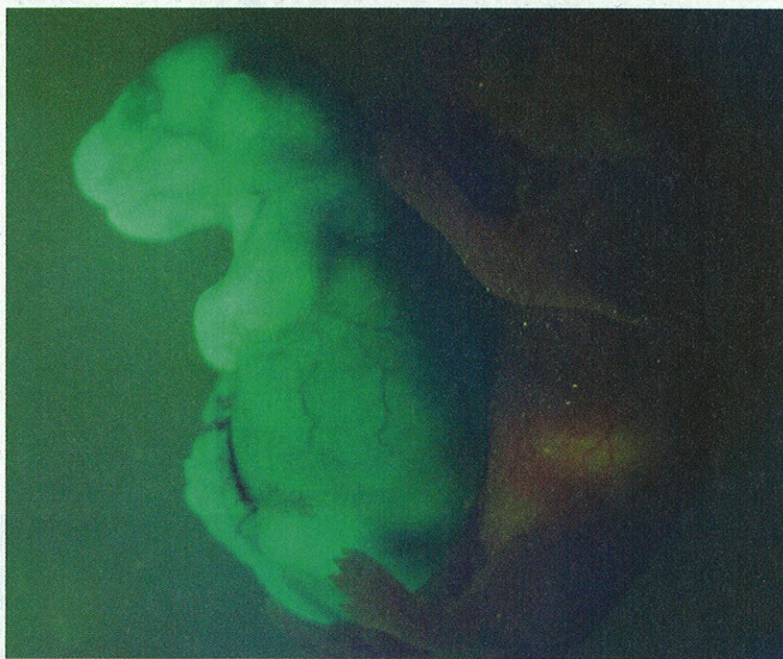
Sa particularité ? Elle ne nécessite pas d'embryon ! Des cellules adultes sont reprogrammées *in vitro*, par injection de quatre gènes qui les ramènent à l'état embryonnaire. De nouvelles perspectives

s'ouvrent, car le résultat obtenu est celui que l'on espérait du clonage – sans ses inconvénients. Mais plusieurs problèmes restent à résoudre avant une éventuelle utilisation thérapeutique.

# Nouveau départ pour les cellules souches

**Cécile Klingler**  
est journaliste à *La Recherche*.

Comment obtenir des cellules souches embryonnaires qui soient immunologiquement compatibles avec un adulte donné ? Jusqu'alors, la réponse tenait en un mot : clonage. Mais la donne change en ce début d'année 2008.



**CE FŒTUS DE SOURIS** provient d'un embryon dans lequel ont été injectées des cellules iPS munies d'un gène codant une protéine fluorescente. La luminescence uniforme de l'animal prouve que les cellules iPS ont contribué au développement de tous les types cellulaires – le fœtus est dit « chimérique ». Ci-contre, une souris chimérique adulte.



Un tir isolé en août 2006, trois coups de canon en juin 2007, une salve victorieuse juste avant Noël : deux ans exactement après le scandale Hwang, qui avait renvoyé la communauté scientifique à la case départ en matière de clonage humain, les articles publiés en rafale par l'équipe de Shinya Yamanaka, au Japon, et celle de James Thompson, aux États-Unis, présentent une nouvelle méthode d'obtention de cellules souches embryonnaires humaines à partir de cellules adultes. Sa particularité ? Pas besoin d'utiliser des ovocytes et des embryons. Il suffit d'administrer un cocktail de quelques gènes à des cellules de peau, pour les « reprogrammer » et les ramener à l'état de cellules souches embryonnaires [1]. Nul ne sait si ces cellules, nommées iPS (pour « cellules souches pluripotentes induites »), répondront aux espoirs qu'elles suscitent. Quoi qu'il en soit, elles bouleversent d'ores et déjà la donne. Témoin, la déclaration à la BBC de Ian Wilmut, le « père » de la brebis Dolly, qui a annoncé qu'il abandonnait le clonage au profit de cette nouvelle technique [2]. Un pari sur l'avenir. Mais à l'heure actuelle, que sait-on, au juste, de ces incroyables cellules iPS ?



Leur histoire commence en 2006, dans le laboratoire de biologie des cellules souches, à l'université de Kyoto. Avec son collègue Kazutoshi Takahashi, S. Yamanaka réalise la première reprogrammation *in vitro* de cellules adultes – en l'occurrence des cellules de souris [3]. Le principe de la manœuvre était simple : insérer dans ces cellules des gènes supposés nécessaires à l'induction et au maintien de la pluripotence, cette capacité duale qu'ont les cellules souches embryonnaires (les cellules ES) de rester indifférenciées tout en conservant leur potentiel de donner n'importe quel type cellulaire.

## Vingt-quatre gènes candidats

La réalité s'est évidemment révélée plus complexe. Car encore fallait-il trouver le bon cocktail pour cette reprogrammation, à supposer qu'il existât. Ce sont pas moins de 24 gènes candidats que les deux biologistes ont testés, seuls ou en combinaison les uns avec les autres. Des candidats, mis en lumière grâce aux travaux menés ces dernières années dans le monde sur les cellules souches embryonnaires humaines et grâce aux expériences de clonage animal. Par ailleurs, il fallait être sûr de repérer les cellules après qu'elles eurent « rajeuni ». Pour ce faire, S. Yamanaka et K. Takahashi ont utilisé des souris transgéniques. Des animaux, chez lesquels

un gène de résistance à un antibiotique était inséré dans un gène appelé *Fbx15*, actif seulement dans les cellules ES. Un traitement antibiotique des cellules en culture ne laissait sauves que les cellules reprogrammées.

Au bout du compte, les deux biologistes ont tapé dans le mille : une combinaison de quatre gènes nommés *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* et *Klf4* s'est révélée suffisante pour obtenir les premières cellules iPS. Des cellules embryonnaires. Enfin, presque. Elles ont, en effet, l'aspect de cellules ES, expriment les marqueurs spécifiques des cellules ES, se multiplient comme des cellules ES et, injectées dans des souris, provoquent des tumeurs constituées de différents types cellulaires – là encore comme les cellules ES. Mais il leur manque quelque chose. Les vraies cellules ES se caractérisent par leur capacité à contribuer à tous les tissus du corps quand on les injecte dans un embryon : l'animal obtenu est qualifié de chimérique. Or, dans le cas présent, point de chimère.

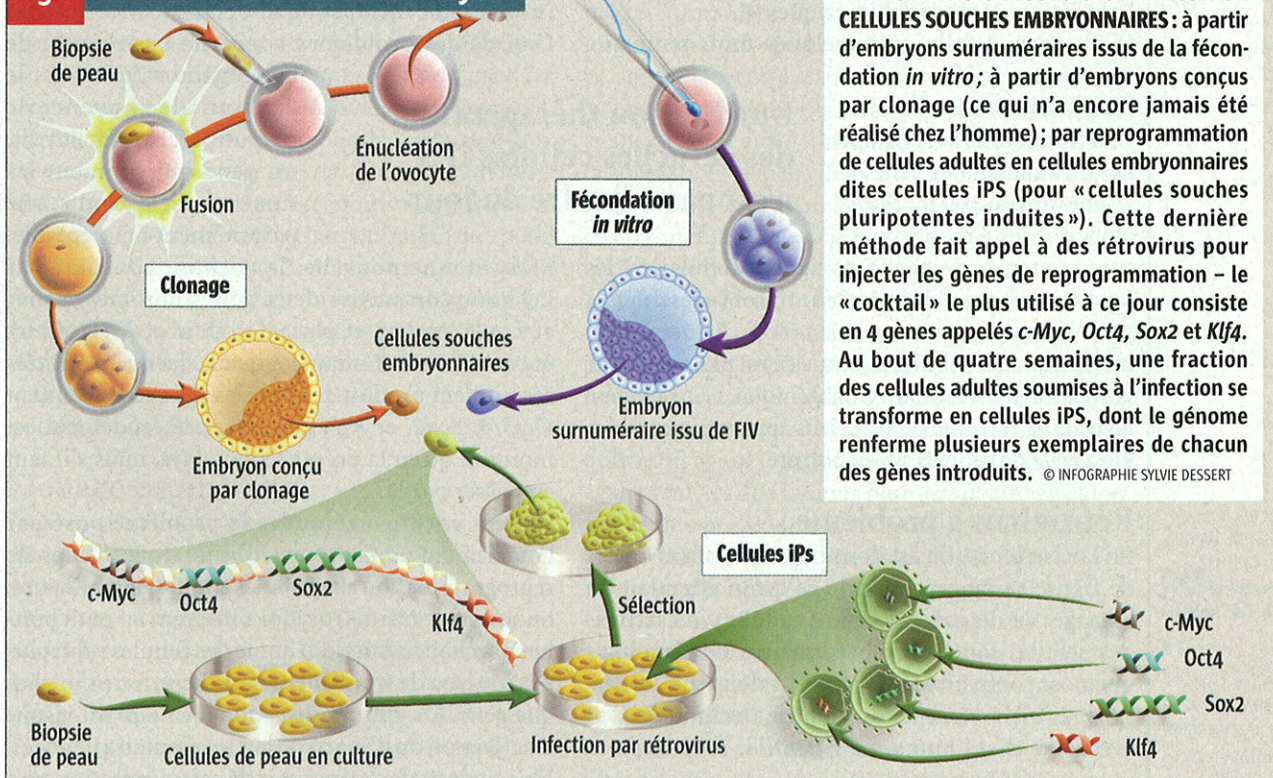
Voilà qui explique sans doute qu'à la publication de ces résultats, en août 2006, les réactions aient été moins enthousiastes qu'on eût pu le penser. Quoi qu'il en soit, la course pour obtenir des cellules iPS réellement embryonnaires était lancée. Et c'est en conservant le même cocktail de 4 gènes ➔

[1] K. Takahashi *et al.*, *Cell*, 131, 861, 2007 ; J. Yu *et al.*, *Science*, 318, 1917, 2007.

[2] <http://tinyurl.com/2py6ym>

[3] K. Takahashi et S. Yamanaka, *Cell*, 126, 663, 2006.

**Fig.1** Cellules souches sans embryon





## Espoir thérapeutique

■ « PERCÉE DE LA RECHERCHE SUR LES MALADIES GÉNÉTIQUES » : à la une du *Monde* le samedi 8 décembre 2007, ce titre a salué les travaux des équipes américaines dirigées par Rudolf Jaenisch et Tim Townes, publiés la veille sur le site Internet de la revue *Science* [1]. Les résultats présentés fournissent une élégante preuve de principe que les cellules souches « embryonnaires » dites iPS, issues de la reprogrammation *in vitro* de cellules adultes, peuvent constituer un outil thérapeutique. En l'occurrence, les biologistes ont réussi à améliorer l'état de souris porteuses de l'anomalie génétique responsable de la drépanocytose. Une maladie caractérisée par un défaut de la structure de l'hémoglobine et des globules rouges en forme de faucille, rigides, qui obstruent les vaisseaux sanguins. Le protocole a consisté

à prélever des cellules de peau des souris malades, à les transformer en cellules iPS, à y remplacer le gène défectueux en gène sain, à transformer ensuite les cellules iPS modifiées en cellules souches hématopoïétiques (productrices des cellules sanguines), et à injecter ces cellules à la souris malade initiale. Beau travail ! Cela dit, ce n'est pas la première fois que des souris atteintes de drépanocytose sont guéries par thérapie génique. Le premier succès remonte à 2001, avec des travaux coordonnés par Philippe Leboulch, directeur de l'unité « thérapie génique hématopoïétique » de l'Inserm, et professeur au MIT. En l'occurrence, la démarche avait consisté à prélever des cellules souches hématopoïétiques chez la souris malade, à y ajouter le gène codant l'hémoglobine saine, et à réinjecter les cel-

lules modifiées à l'animal [2]. Des années de développement préclinique ont suivi. Et un premier essai clinique de phase I a enfin pu être lancé, il y a un an et demi [3], par la société de biotechnologie Genetix France (filiale de Genetix Pharmaceutical, dont P. Leboulch est le vice-président). Placé sous la direction scientifique de ce dernier, il est coordonné sur le plan clinique par Éliane Gluckman, de l'hôpital Saint-Louis. Il devrait à terme concerner cinq patients atteints de drépanocytose, et cinq atteints d'une autre pathologie sanguine, la  $\beta$ -thalassémie, pouvant être corrigée par le même gène. Pour l'instant, deux patients atteints de cette seconde maladie ont été traités.

[1] J. Hanna *et al.*, *Science*, 318, 1920, 2007.

[2] R. Pawliuk *et al.*, *Science*, 294, 2368, 2001.

[3] A. Banks *et al.*, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1054, 308, 2005.

⇒ de reprogrammation, mais en changeant le gène servant à sélectionner les cellules « rajeunies », que les trois équipes de S. Yamanaka, de Rudolf Jaenisch (au MIT), et de Konrad Hochedlinger (à l'institut des cellules souches de Harvard) ont abouti au succès en juin 2007. Une réussite, cette fois attestée par l'obtention de souris chimériques [4].

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 J. Thompson [fig. 1]. Mais, alors que les Américains se sont contentés de partir de lignées cellulaires, les Japonais ont procédé à partir de fibroblastes de peau prélevés sur une personne bien réelle. Évidemment, la sélection des cellules rajeunies n'est pas passée par la création d'un humain transgénique... On a repéré les cellules rajeunies d'après leur apparence, semblable à celle de cellules ES en culture.

### L'utilisation thérapeutique des actuelles cellules iPS n'est pas à l'ordre du jour

Cela dit, il faut se garder d'un emballement excessif. Les actuelles cellules iPS seront indéniablement riches en enseignements sur le plan fondamental, mais elles posent plusieurs problèmes qui rendent pour l'heure inenvisageable leur utilisation en clinique, quand bien même on a prouvé, sur le principe, leur utilité (lire « Espoir thérapeutique », ci-dessus).

L'un de ces problèmes concerne la présence de l'oncogène *c-Myc* dans le cocktail de jouvence le plus utilisé. Autrement dit, un gène qui promeut les tumeurs. Cela rend *c-Myc* parfaitement inacceptable.

Mais, bonne nouvelle, le cocktail concocté par J. Thompson utilise deux gènes nommés *Nanog* et *Lin28*, en lieu et place de *c-Myc* et *Klf4*. Mieux encore : tant S. Yamanaka que R. Jaenisch ont très récemment produit des cellules iPS avec seulement *Oct3/4*, *Sox2*, et *Klf4* [5]. Certes, le rendement est moindre qu'en la présence de *c-Myc*, mais s'il faut en passer par là...

Restera encore à résoudre le problème posé par l'outil même qui permet d'injecter les gènes de reprogrammation aux cellules adultes. Pour l'heure, on se sert de rétrovirus, qui s'insèrent au petit bonheur la chance dans le génome des cellules – qui plus est, à raison de trois à six sites d'insertion pour chaque gène. Or, qui dit insertion aléatoire dit risque d'activation ou d'inactivation involontaire de gènes. Il s'agit donc de s'affranchir de cette limitation, soit

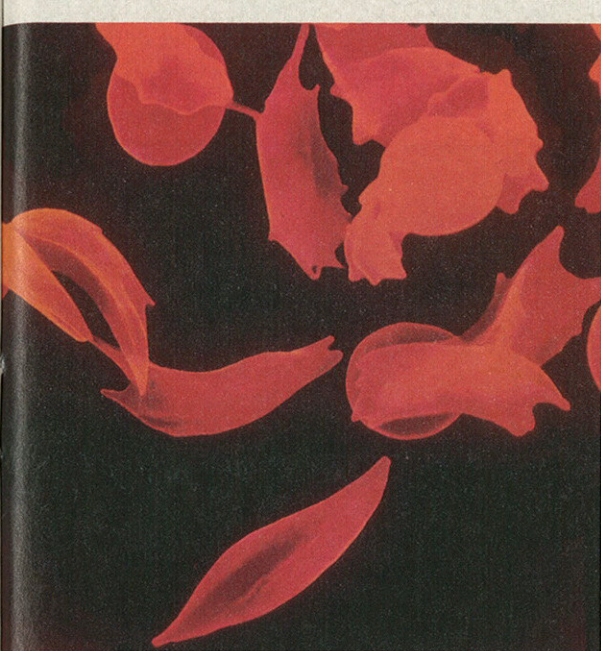
[4] K. Okita *et al.*, *Nature*, 448, 313, 2007 ; M. Wernig *et al.*, *Nature*, 448, 318, 2007 ; N. Maherali *et al.*, *Cell Stem Cell*, 1, 55, 2007.

[5] M. Nakagawa *et al.*, *Nat. Biotech.*, doi: 10.1038/nbt1374, 2007 ; M. Wernig *et al.*, *Cell Stem Cell*, doi: 10.1016/j.stem.2007.12.2001

### Rétrovirus à problème

En l'occurrence, on est donc bel et bien dans un cas de figure se rapprochant de ce qu'on attendait du clonage : au départ, des cellules adultes ; à l'arrivée, des cellules souches embryonnaires immunologiquement compatibles avec l'adulte donneur. Et cela, sans les inconvénients du clonage (technique dont la réussite chez l'humain n'a, faut-il le rappeler, toujours pas été prouvée).





**CARACTÉRISÉE PAR DES GLOBULES EN FAUCILLE** (ci-dessus), la drépanocytose, aussi appelée anémie falciforme, est une maladie génétique qui provient d'une mutation d'un unique gène qui code l'une des chaînes de l'hémoglobine. © WALTER REINHART - PHOTOTAKE - ISM

en mettant au point d'autres vecteurs, soit en identifiant des molécules capables d'induire la reprogrammation sans qu'il soit besoin de faire appel à du transfert de gènes.

La limite est de taille – il n'est que de voir les problèmes auxquels se heurte la thérapie génique, grande conceptrice de vecteurs divers et variés. Néanmoins, un certain optimisme est perceptible. À la question : « Êtes-vous d'accord avec Wilmut sur le fait que cette percée va écarter la nécessité de recourir au clonage ? », S. Yamanaka a récemment répondu : « Il y a le problème des rétrovirus à surmonter. Si nous n'y arrivons pas, le clonage sera encore nécessaire. Cependant, je pense que c'est réalisable [6]. » Une réalisation qui, pour I. Wilmut, nécessite de s'affranchir du fantasme de la personnalisation à outrance : comme avec le clonage, l'objectif serait de bâtir des banques de cellules couvrant l'ensemble des profils d'histocompatibilité\* de la population, et pas de créer des lignées cellulaires spécifiques de chaque patient [7].

## Clonage de primate

L'avenir dira ce que valent les cellules iPS sur le plan clinique. Mais il délivrera peut-être aussi quelques surprises du côté du clonage. Car s'il n'existe toujours aucune lignée de cellules souches embryonnaires humaines obtenues à partir d'embryons clonés, il existe maintenant des lignées de telles cellules de primates ! De macaques plus exactement. Hasard du calendrier, ces données ont été publiées la même semaine que l'annonce de l'obtention de

cellules iPS humaines [8]. Cela, après un parcours de validation inhabituel, visant à vérifier qu'il s'agissait bien de clonage – les traces du scandale Hwang sont profondes.

En termes de rendement, la réussite du protocole de clonage mis au point est pour l'instant très faible : deux lignées créées pour 304 ovocytes prélevés. Mais un saut qualitatif est indéniablement franchi, tant les échecs précédents avaient été cinglants. L'auteur de ces nouveaux travaux, Shoukhrat Mitalipov, de l'université de l'Oregon, compte bien ne pas en rester là. Il a engagé une collaboration avec l'équipe d'Alison Murdoch, à Newcastle, autorisée par l'autorité de régulation britannique, la HFEA, à tenter des expériences de clonage humain. Son espoir ? Que le protocole ayant mené au succès chez les singes se révèle transposable chez l'homme, ce qui signifierait que des cellules humaines adultes peuvent être « naturellement » reprogrammées en cellules souches embryonnaires.

## Bataille bioéthique

Reste que gagner une supposée course de vitesse avec le clonage n'est nullement la préoccupation des chercheurs ayant mis au point les cellules iPS (et réciproquement). La crainte est ailleurs : qu'en raison de la publicité médiatique faite à ces cellules, citoyens et hommes politiques en concluent que la recherche sur les cellules ES issues d'embryons surnuméraires est désormais inutile. En octobre, avant même l'annonce de la création de cellules iPS humaines, S. Yamanaka, R. Jaenisch et K. Hochedlinger publiaient une tribune dans la revue *Cell Stem Cell* [9], soulignant combien les travaux sur les cellules ES avaient compté pour la mise au point du protocole ayant conduit aux cellules iPS, combien ils étaient désormais indispensables à l'amélioration de ces mêmes cellules, et combien ils étaient prometteurs en eux-mêmes, avec déjà des essais précliniques, en cardiomédecine par exemple.

Nul doute cependant que les opposants aux recherches menées à partir d'embryons argueront de l'existence des cellules iPS – même imparfaites – pour rallier à leur cause les indécis. On peut, par exemple, parier sur une féroce bataille aux États-Unis, quelques mois avant l'élection présidentielle. En France également, les discussions pourraient être vives lors des débats précédant la révision de la loi relative à la bioéthique, prévue en 2009. Alors même qu'en 2006, les députés Pierre-Louis Fagniez (UMP), et Alain Claeys (PS) présentaient chacun un rapport aux conclusions similaires : autoriser pleinement les recherches sur les embryons surnuméraires (elles ne sont aujourd'hui autorisées que par dérogation), et légaliser le clonage à visée thérapeutique, pour l'heure strictement interdit [10]. ■ C. K.

[6] S. Yamanaka, *New Scientist*, 2634, 44, 2007.

[7] I. Wilmut, *Cell Stem Cell*, 1, 593, 2007.

[8] J.A. Byrne *et al.*, *Nature*, 450, 497, 2007.

[9] I. Hyun *et al.*, *Cell Stem Cell*, 1, 367, 2007.

[10] <http://tinyurl.com/2aqu45> ; <http://tinyurl.com/yqqng7>

\* Les gènes d'histocompatibilité codent des protéines exprimées à la surface des cellules et impliquées dans la distinction entre le soi et le non-soi.

### POUR EN SAVOIR PLUS

■ Dossier spécial « L'avenir du clonage humain, après le scandale coréen », *La Recherche*, n° 394, p. 30, février 2006.