

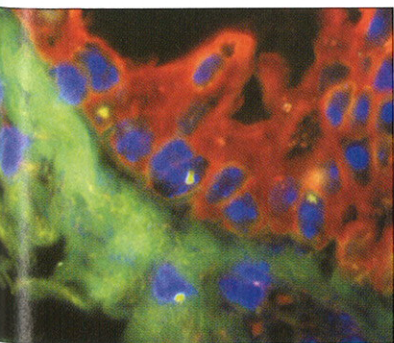
pour, ensuite, en tirer parti : cette ambition se déploie également en ce qui concerne les cellules souches embryonnaires. Des cellules intrinsèquement empreintes de dualité : elles sont en effet capables de se multiplier à l'infini à l'état indifférencié, mais aussi, dans certaines conditions, de se différencier en des types cellulaires variés. Quelles sont les clés de ce balancier ? Des souris à l'homme, un début de réponse se dégage peu à peu (p. 28). Enfin, cap sur cellules souches et médecine ; retour aux greffes de moelle osseuse citées plus haut (p. 32). Des freins auxquels leur utilisation s'est heurtée, aux solutions trouvées pour les desserrer, autant d'éléments susceptibles de faciliter, un jour peut-être, l'utilisation de tous les types de cellules souches.

Le surprenant potentiel des cellules adultes

On croyait les cellules souches adultes d'un tissu donné condamnées à n'engendrer que les types cellulaires correspondant à ce tissu. Or, elles semblent pouvoir s'affranchir de ces limitations. Un constat qui bouleverse certains concepts fondamentaux, et ouvre d'inespérées (mais lointaines) perspectives thérapeutiques.

Ali Turhan

est médecin et chercheur au sein de l'unité de thérapie cellulaire (département de biologie clinique et unité Inserm 362), à l'institut Gustave-Roussy de Villejuif.



Une souris femelle a reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques mâles. Plusieurs mois après, certaines cellules épithéliales de ses poumons portent un chromosome Y ! Trois petits points vert pâle révélateurs.

© D. Krause et al.

Comment définir la nature « souche » de certaines cellules ? Classiquement, par leur capacité à générer des cellules différenciées, d'une part, et par leur capacité à s'autorenouveler, d'autre part. Ces cellules préservent ainsi l'intégrité et la fonction du tissu auquel elles appartiennent. C'est au niveau de la production des cellules du sang, désignée par le terme « *hématopoïèse* », que la notion de cellules souches a principalement été étudiée. On sait que la moelle osseuse produit un grand nombre de cellules ayant des fonctions diverses, comme les globules rouges (transport d'oxygène), les plaquettes (coagulation) et les leucocytes (fonction anti-infectieuse). Ces cellules, parfaitement bien caractérisées sur le plan morphologique depuis de nombreuses années, ont cependant une durée de vie limitée : cent vingt jours pour les globules rouges, sept jours pour les plaquettes et vingt-quatre heures pour les leucocytes. C'est donc en permanence qu'elles sont produites dans la moelle osseuse d'un individu : deux milliards de globules rouges par kilogramme de poids corporel par jour – soit l'équivalent du volume sanguin tous les mois. A l'origine de ce renouvellement ? Une classe de cellules primitives capables de donner naissance aux différentes lignées de cellules du sang par une activité de différenciation régulée. Dès les années 1960, des expériences de transplantation

de moelle osseuse chez la souris ont montré qu'il existait une cellule souche commune aux globules rouges, aux globules blancs et aux plaquettes, résultats plus tard confirmés dans les cellules humaines par l'étude de certaines pathologies⁽¹⁾. On sait par ailleurs qu'il existe des cellules à potentialité « souche » dans d'autres tissus, comme l'épithélium intestinal ou l'épiderme. Le dogme qui était établi à la lumière des expériences réalisées dans ces systèmes postulait l'existence, dans chaque tissu postnatal, de cellules souches spécifiques de ce tissu, y permettant le maintien à long terme de cellules différenciées et fonctionnelles en quantité constante. Il était également établi que, dans certains organes comme le cerveau, l'activité des cellules souches cessait à l'âge adulte.

Dogme mis à bas. Depuis quelques années, ce dogme, qui attribuait un caractère figé à l'activité des cellules souches chez l'adulte, a été défié de plusieurs manières. L'un de ces défis a été la démonstration, chez la souris, de la persistance de ce type de cellules dans certaines zones du cerveau et de leur capacité à générer des cellules neuronales : ces régions contiennent des cellules capables de donner naissance à des neurones chez la souris adulte par un phénomène de différenciation locale⁽²⁾⁽³⁾. Parallèlement, il est devenu clair,

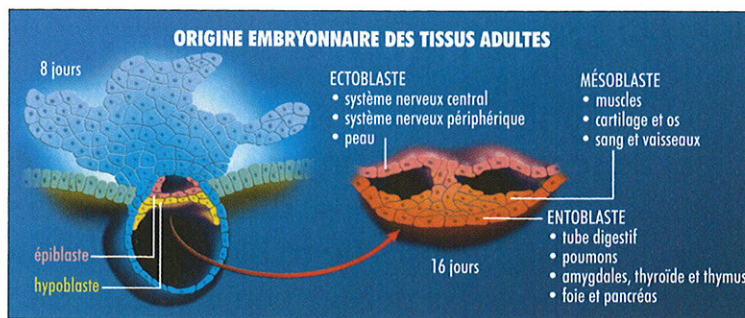


Figure 1. Tout tissu adulte dérive de l'un des trois types cellulaires qui se dessinent très tôt lors du développement de l'embryon. Ce sont les trois « feuillets embryonnaires » : ectoblaste, mésoblaste et entoblaste. Qu'une cellule souche hématopoïétique se différencie en muscle est déjà surprenant. Qu'elle se différencie en foie l'est bien plus encore, en raison du saut « interfeuille » que cela représente.

***Phénotype**
ensemble des caractères
morphologiques
et physiologiques
d'un individu.

notamment chez la souris, que des tissus adultes présentant un phénotype* de différenciation tout à fait distinct – muscle, cerveau, moelle osseuse... – renferment des cellules capables de se différencier en d'autres types cellulaires. Ainsi, les cellules de moelle osseuse peuvent générer, après transplantation chez un autre animal, des cellules de type neuronal⁽⁵⁾, myocardique⁽⁴⁾ ou hépatique⁽⁵⁾. Inversement, des populations cellulaires issues du tissu neural ou de muscle contiennent apparemment des cellules capables, après transplantation, d'engendrer des cellules spécialisées de type myéloïde (différenciation vers les globules rouges) et lymphoïde (différenciation vers des cellules présentant les marqueurs T et B, donc pouvant théoriquement jouer un rôle immunitaire)^(6,7). De plus, ces

mêmes cellules souches du cerveau contribuent, lorsqu'elles sont injectées dans des blastocystes, à la génération de tissus d'origine embryologique distincte chez les souriceaux qui se développent à partir de ces embryons⁽⁸⁾. Ces résultats contribuent à malmenier fortement un concept fondamental issu des études d'embryologie classique, celui de « développement dirigé » : une fois qu'une cellule est engagée, au cours du développement, dans un lignage donné, elle ne peut être respécifiée pour effectuer les fonctions d'un autre lignage (fig. 1). Mais on sait, depuis les expériences de transfert nucléaire ayant donné naissance à la brebis Dolly, que la reprogrammation du noyau des mammifères est faisable. Ces inattendus changements de lignée ont soulevé l'hypothèse de la persistance, à l'âge adulte, de cellules souches d'origine embryonnaire, communes à plusieurs tissus et dont le potentiel de différenciation serait réactivé en fonction de l'environnement tissulaire⁽⁹⁾. En quelque sorte, des cellules ayant la capacité de générer des cellules filles en très grande quantité pendant la vie de l'individu, avec le maintien d'un potentiel d'autorenouvellement... Mais pour prouver leur existence, encore faudrait-il pouvoir les identi-

fier par la présence d'un marqueur commun. Or, la seule propriété qui semble distinguer les cellules souches présentes dans la moelle et dans le muscle des autres types de cellules est leur capacité à exclure certains colorants. Cependant, comme ce critère fonctionnel est loin de caractériser de manière définitive une cellule souche, on peut dire qu'aujourd'hui les marqueurs de cellules souches « universelles » éven-

ue devient le concept
« développement
dirigé », selon lequel
une cellule d'un lignage
donné ne peut
changer de destin ?

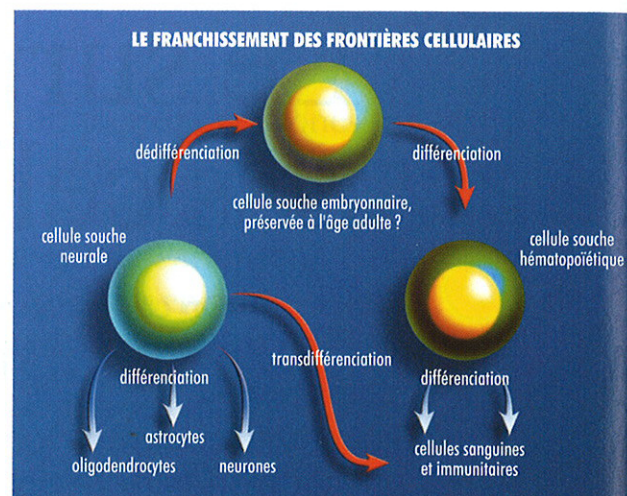


Figure 2. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer la capacité des cellules souches adultes à se différencier en cellules d'un lignage différent. L'une postule l'existence d'une cellule souche « embryonnaire » qui serait préservée à l'âge adulte dans tous les tissus. L'autre s'affranchit d'une telle cellule, et avance l'idée d'un phénomène direct de transdifférenciation.

tuellement présentes dans plusieurs tissus restent à découvrir. L'hypothèse alternative postule, quant à elle, l'existence d'un phénomène de « transdifférenciation » : une cellule souche d'un lignage donné, système nerveux par exemple, pourrait se différencier en cellules d'un autre lignage – hématopoïétique... (fig. 2). Là encore, le micro-environnement de ces cellules exercerait probablement un impact majeur sur leur devenir. Mais comment une cellule peut-elle à la fois rester « souche » et donner naissance à des cellules différenciées ? L'hypothèse la plus probable est qu'elle se divise selon un mode asymétrique, avec génération d'une cellule fille différenciée d'un côté, et d'une cellule qui reste « souche » de l'autre – on connaît d'ailleurs certaines molécules capables de contrôler ce type de divisions cellulaires au niveau des cellules souches hématopoïétiques.

cherche a publié :
ssier « Neurones
nté », mars 2000.

En deux mots

Certaines expériences récentes semblent montrer qu'une cellule souche d'un lignage donné serait capable de donner naissance à des cellules d'un lignage totalement différent. Par exemple, les cellules souches de la moelle osseuse engendreraient des cellules de type neuronal. Inversement, des progéniteurs neuronaux donneraient naissance à des cellules sanguines. Comment prouver irréfutablement ces phénomènes ? En s'assurant de la pureté des cellules souches utilisées. En démontrant la fonctionnalité des cellules filles engendrées. Comment, ensuite, les expliquer ? Deux théories s'affrontent. Mais, à l'heure actuelle, difficile de privilégier l'une plutôt que l'autre...

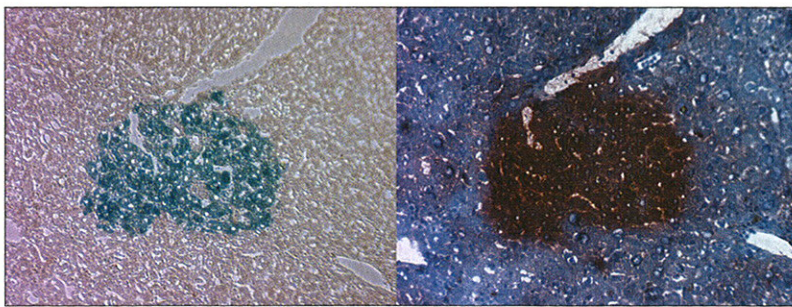
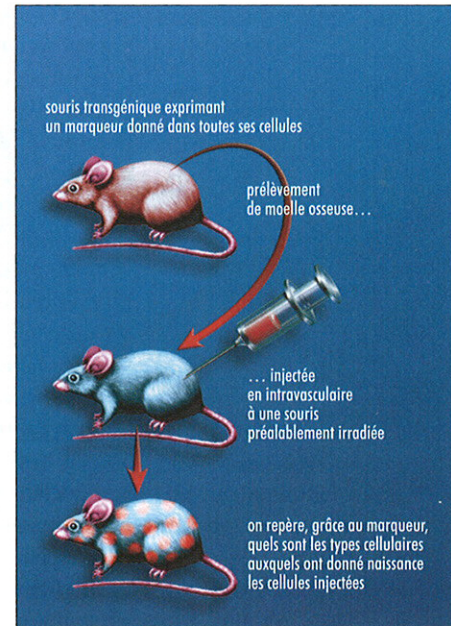


Figure 3. La stratégie mise en œuvre est simple : la moelle d'une souris transgénique exprimant dans toutes ses cellules un marqueur facilement détectable est greffée à une souris dont la moelle a été préalablement détruite par irradiation. La survie de l'animal receveur témoigne de la réussite de la greffe. La détection du marqueur dans des cellules autres que les lignées sanguines témoigne, elle, d'une possible transdifférenciation des cellules greffées. Sur la photo, des cellules souches hématopoïétiques sélectionnées ont été greffées à une souris dépourvue d'une enzyme hépatique vitale. Après cette greffe, le marqueur d'origine a été détecté dans quelques îlots cellulaires du foie de l'hôte (en bleu, sur la photo de gauche). Mieux encore, ce fut aussi le cas de l'enzyme initialement absente (rouge sombre, à droite), enzyme qui s'est révélée fonctionnelle. La souris a survécu à sa pathologie d'origine⁽⁵⁾. © E. Lagasse et al.



Choix cornélien. Choisir entre les deux hypothèses précitées est impossible en l'état actuel des techniques. Pour acquérir une certitude, il faudra pratiquer des expériences de transplantation à l'échelon clonal, c'est-à-dire avec des cellules parfaitement homogènes. En effet, montrer qu'un tissu comme le muscle possède un potentiel de génération de cellules hématopoïétiques ne signifie pas qu'une cellule souche musculaire soit à l'origine de cette différenciation. Ce pourrait tout aussi bien être une cellule souche hématopoïétique circulant dans le sang irriguant l'organe. Il est donc impératif de disposer de marqueurs cellulaires permettant de sélectionner des types cellulaires précis au sein d'un tissu donné et de disposer également de trieurs de cellules très performants. C'est pourquoi ce type d'expériences n'a pu, jusqu'à présent, être réalisé que dans un cas bien précis : des cellules souches provenant de la moelle osseuse de souris et sélectionnées par la présence, à leur surface, de marqueurs hématopoïétiques, ont ensuite été greffées à d'autres souris. Elles ont donné naissance à des cellules très diverses – cellules de l'épithélium pul-

monaire ou gastrique, cellules hématopoïétiques⁽¹⁰⁾... Ces résultats permettent de valider non seulement la notion de plasticité cellulaire, mais aussi celle de pluripotentialité, puisqu'une seule cellule greffée peut générer, après plusieurs divisions, des cellules de phénotypes très différents. Encore faut-il rappeler que le phénotype d'une cellule se rapporte non seulement à sa morphologie, mais aussi à sa fonction. En la matière, les seules expériences vraiment convaincantes de l'existence d'un vrai changement de phénotype sont celles qui ont consisté à injecter, à une souris, des cellules hématopoïétiques médullaires sélectionnées en fonction de la présence de marqueurs bien précis, et à démontrer la génération de cellules hépatocytaires permettant de corriger un déficit enzymatique héréditaire⁽⁵⁾ (fig. 3). La possibilité de générer des cellules exprimant des fonctions différentes de celles de la cellule d'origine représente probablement la preuve que le phénomène de transdifférenciation cellulaire n'est pas simplement une curiosité de laboratoire, mais présente une réelle signification au niveau de la biologie du développement en général.

Au-delà de ces apports majeurs sur le plan fondamental, la découverte du phénomène de plasticité cellulaire ouvre des perspectives thérapeutiques majeures⁽¹¹⁾. On sait, par exemple, depuis de nombreuses années, que des greffes de moelle et de cellules souches sanguines circulantes sont applicables chez l'homme (voir l'article de Dominique Thierry, p. 32). Elles sont devenues un standard thérapeutique dans certaines indications en cancérologie. Dans toutes ces applications, le but recherché est de remplacer la moelle de la personne atteinte par l'utilisation de cellules prélevées dans la fratrie (allogreffe) ou chez le patient en période de rémission (autogreffe). Avec la démonstration de la possibilité d'obtenir d'autres types tissulaires à partir de cellules souches de moelle osseuse, le champ d'application de ce type de greffes pourrait s'élargir de manière considérable. Ainsi, les cellules de moelle osseuse pourraient être

Un marqueur universel pour les cellules souches adultes ?

La moelle osseuse est sans doute le tissu le mieux caractérisé au niveau des marqueurs qui permettent d'identifier des cellules souches, notamment chez la souris. Chez cette dernière, les techniques de greffe de cellules identifiées par certains marqueurs définis permettent aujourd'hui de reconstituer l'ensemble des cellules de moelle et du sang d'une souris irradiée avec un nombre très faible de cellules, voire des cellules uniques ! Ainsi, les cellules ayant des marqueurs de surface comme Sca1 et c-kit ont un potentiel de prolifération et de différenciation hématopoïétique majeur après greffe chez la souris. Ces cellules ont été rapportées comme étant également à l'origine d'une différenciation hépatique. Plus récemment, d'autres marqueurs ont pu être identifiés par la capacité d'exclusion de certains colorants vitaux, grâce à l'expression à la surface de ces cellules d'une pompe qui exclut activement cette substance. Ces cellules dites « SP » sont également pluripotentes et ont été identifiées dans plusieurs tissus, comme le foie, la moelle et le muscle, ainsi qu'au niveau des cellules souches embryonnaires. Le défi majeur pour le futur sera d'identifier un marqueur universel permettant d'identifier l'ensemble des cellules souches, marqueur dont l'existence... reste à démontrer !

- (1) Prchal et al., *Nature*, 274, 590, 1978.
- (2) F. H. Gage, *Science*, 287, 1453, 2000.
- (3) T. R. Brazelton et al., *Science*, 290, 1775, 2000.
- (4) D. Orlic et al., *Nature*, 410, 701, 2001.
- (5) E. Lagasse et al., *Nat. Med.*, 6, 1229, 2000.
- (6) C. R. Bjornson et al., *Science*, 283, 534, 1999.
- (7) K. A. Jackson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 14482, 1999.
- (8) D. L. Clarke, *Science*, 288, 1660, 2000.
- (9) H. M. Blau et al., *Cell*, 105, 829, 2001.
- (10) D. S. Krause, *Cell*, 105, 369, 2001.
- (11) E. Lagasse et al., *Immunity*, 14, 425, 2001.
- (12) E. Gussoni et al., *Nature*, 401, 390, 1999.

utilisées pour réparer des tissus nerveux chez les patients atteints de maladies neurales dégénératives, contre lesquelles il n'existe aucun traitement à l'heure actuelle. De même, elles pourraient être mises à profit pour générer des cellules de foie chez les malades atteints d'insuffisance hépatocellulaire. Cependant, plusieurs étapes devront être franchies avant l'application de ce type de stratégies chez l'homme. D'abord, le phénomène de plasticité tissulaire devra être optimisé et rendu efficace. En effet, la possibilité d'obtenir un effet thérapeutique par utilisation de cellules souches hématopoïétiques chez un enfant atteint de myopathie, par exemple, est très faible si le pourcentage de cellules générées reste en dessous de 1 %–5 %. Or, c'est ce type de résultats qui a été obtenu dans le modèle murin utilisé⁽¹²⁾. En fait, le pourcentage de « conversion phénotypique » au sein d'une population de cellules souches adultes données est inconnu. Et si seule une fraction d'entre elles était capable de se redifférencier ? On peut également imaginer qu'elles aient toutes le même potentiel de changement, mais que ce dernier soit très faible. Ou encore, qu'il soit élevé dans l'absolu, mais limité dans la pratique par le tissu receveur. Une meilleure caractérisation des cellules injectées, ainsi que le développement de techniques de culture *ex vivo* de ces cellules sera donc

nécessaire, de manière à augmenter la quantité de cellules disponibles, éventuellement sous le contrôle de certaines molécules exogènes à définir. Enfin, il sera indispensable de disposer de modèles pathologiques chez l'animal de laboratoire, pour tester l'efficacité thérapeutique des traitements envisagés.

Clé décisive. Enfin, le problème et le défi majeur seront de découvrir les facteurs qui permettent de réguler le phénomène de plasticité ou de transdifférenciation. En effet, on sait que des centaines de protéines ayant une activité inhibitrice ou stimulatrice se fixent sur l'ADN et contrôlent les processus de différenciation, de prolifération et de mort cellulaire. Parmi ces facteurs protéiques désignés sous le terme de facteurs de transcription, il s'agira d'identifier des molécules capables de diriger le destin d'une cellule hématopoïétique vers la différenciation hépatique ou musculaire, ou vers la possibilité de génération d'une autre cellule « souche ». Peut-être, alors, trouvera-t-on le facteur qui rend une cellule souche, vraiment « souche ».

A. T. ■

Pour en savoir plus

- www.recherche.gouv.fr/rapport/cellules/cellsouches.pdf
- www.stemcellresearch.org/facts.htm

Embryon : des souris et des hommes

Multiplication à l'infini et capacité d'engendrer toutes sortes de types cellulaires : ces deux caractéristiques des cellules souches embryonnaires leur valent le qualificatif de « pluripotentes ». Quels sont les facteurs qui gouvernent cet état très particulier ? Coup d'œil sur les éléments clés peu à peu découverts.

Cécile Klingler

est journaliste
à La Recherche.

« Je me souviendrai toujours du moment où nous avons vu les premiers blastocystes humains, en 1972 : ils étaient magnifiques *in vitro* », se rappelle Robert Edwards, dans une interview accordée à CBS en septembre dernier. Il venait de recevoir le prestigieux prix Lasker 2001 de biologie médicale clinique pour ses travaux sur la fécondation *in vitro* – travaux qui devaient aboutir à la naissance du premier « bébé-éprouvette », Louise Brown, en 1978. Dans cette même interview, Robert Edwards souligne l'apport crucial des travaux de FIV dans le développement d'un champ de recherche déjà entrevu à l'époque, mais laissé de côté : les cellules souches embryonnaires humaines. Car, sans blastocystes, pas de cellules souches. C'est en effet à ce stade du développement – cinq jours – qu'elles sont prélevées. L'embryon se présente alors sous la forme d'une sphère qui serait tota-

lement creuse, n'était-ce la présence d'un petit amas de cellules appelé « bouton embryonnaire » (voir photo ci-contre). Dès le début de l'implantation dans la paroi utérine, l'enveloppe de la sphère, ou trophoblaste, évolue pour donner le placenta. Le bouton embryonnaire, lui, s'engage dans un processus qui aboutira à la formation de tous les tissus du futur enfant.

In vivo, in vitro. C'est en raison de ce formidable potentiel de différenciation que les cellules qui constituent le bouton sont dites « pluripotentes ». Mais pas totipotentes ! Car, contrairement à l'œuf ou aux cellules issues des premiers stades de sa division, elles ne peuvent donner un blastocyste capable de se développer *in utero* et de donner un être humain. C'est en 1998 qu'ont été publiés, dans la revue *Science*,