



**Synthèse du rapport présenté en juin 2001 par le NIH intitulé :**

## **STEM CELLS : SCIENTIFIC PROGRESS AND FUTURE RESEARCH DIRECTIONS**

<http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>

Dans la préface les auteurs précisent que ce rapport fait état des recherches effectuées sur les cellules souches à la date du 17 juin 2001. Il a été établi à partir de plus de 1200 publications scientifiques. Des experts scientifiques du monde académique, américain et étranger, ainsi que des scientifiques du secteur privé, y ont participé.

### **1 La cellule souche**

Le premier chapitre est consacré à la définition de la cellule souche : « une cellule souche est une cellule qui a la capacité de se diviser (de se répliquer) pendant des périodes indéfinies, souvent durant la vie de l'organisme. Dans des conditions normales, ou à partir d'un signal adéquat, les cellules souches donnent naissance (se différencient) en les différents types cellulaires constituant l'organisme. Les cellules souches ont la potentialité de se développer en cellules matures qui ont la forme caractéristique et les fonctions spécialisées telles que : cellules cardiaques, cellules de la peau ou cellules nerveuses.

L'œuf fécondé, le zygote, est dit totipotent il fournit 200 catégories de cellules. Le terme de multipotent est souvent utilisé pour décrire les cellules souches qui donnent naissance aux cellules dérivées des trois feuilletts embryonnaires : mésoderme, endoderme et ectoderme. Le terme d'unipotent est réservé aux cellules de l'organisme adulte qui ont la capacité de donner naissance à un seul type cellulaire.

La cellule souche embryonnaire est définie par son origine, elle est dérivée de la masse interne du blastocyste avant son implantation dans l'utérus.

La cellule souche adulte est une cellule indifférenciée qui est trouvée dans un tissu différencié. Des cellules souches adultes ont été trouvées dans la moelle osseuse, la cornée et la rétine de l'œil, la pulpe dentaire, le foie, la peau, le tractus gastro-intestinal et le pancréas.

### **2 La cellule souche embryonnaire**

Dans ce chapitre seules les cellules souches embryonnaires de la souris sont traitées.

#### **Propriétés des cellules souches embryonnaires (ES) :**

- dérivées de la masse interne du blastocyste, capables de se multiplier sans se différencier,
- maintenir une situation diploïde,
- être pluripotentes,
- être capables de s'intégrer dans tous les tissus fœtaux durant le développement,
- être capables de coloniser la lignée germinale et de donner naissance à des cellules germinales,
- être clonables, une seule cellule doit donner naissance à une colonie de cellules identiques,
- exprimer le facteur de transcription Oct-4 qui active ou inhibe chez l'hôte des gènes ciblés et maintient les cellules ES dans un état prolifératif non différencié

- pouvant être induites à proliférer ou à se différencier
- stade G1 absent du cycle cellulaire, les cellules ES sont au stade S du cycle cellulaire durant lequel elles synthétisent le DNA. A la différence des cellules somatiques les cellules ES ne requièrent pas de stimulus externe pour initier la replication du DNA.
- ne montrent pas d'inactivation d'un chromosome X au contraire des cellules somatiques femelles.

### **Pluripotence des cellules souches**

Trois types d'expérience ont démontré la pluripotence des cellules souches :

1. injection de cellules ES dans la cavité d'un autre blastocyste : les embryons présentent un chimérisme combinant les tissus de l'hôte et du greffon. (Le remplacement total de la masse interne d'un blastocyste par des cellules souches provenant d'un autre embryon semble être affecté par le nombre de passages dans le milieu de culture, mais ceci reste à déterminer).
2. injection d'une cellule souche sous la peau ou dans le rein d'une souris immuno-déficiente : les tératomes qui se forment contiennent tous les types cellulaires
3. l'addition de LIF (leukemia inhibitor factor) au milieu de culture provoque la formation de corps embryoides comparables aux tératomes de l'expérience précédente.

Trois espèces de mammifères ont montré cette capacité des cellules souches : la souris, le singe et l'homme

### **Différenciation in-vitro d'une cellule souche de souris en un type cellulaire particulier**

Par l'utilisation de facteurs de croissance spécifiques ou par la transfection de gènes étrangers dans la cellule souche on a pu obtenir 19 types différents de cellules dont : des neurones, du muscle strié, et du muscle lisse .

## **3 La cellule souche embryonnaire humaine et la cellule germinale embryonnaire humaine**

En 1998

- J Thomson publiait une méthode pour obtenir des cellules souches embryonnaires (ES) à partir de la masse interne du blastocyste humain
- J. Gearhart rapportait l'obtention de cellules germinales embryonnaires (EG) à partir des cellules des crêtes des gonades et du mésenchyme d'embryons de 5 à 9 semaines.

### **Source de cellules souches embryonnaires humaines (ES)**

Les blastocystes de 5 jours, après la fertilisation, sont utilisés pour la culture de cellules ES ils comportent alors 200 à 250 cellules dont la plus grande partie compose le trophoctoderme . La masse interne est alors composée de 30 à 34 cellules qui sont les cellules souches embryonnaires (ES).

### **Source de cellules embryonnaires germinales humaines (EG)**

Les cellules EG sont dérivée des cellules germinales primordiales qui apparaissent dans les crêtes gonadiques (ou éminences génitales) qui fourniront les gamètes matures. Ces cellules ont une haute capacité proliférative et sont représentatives des multiples lignées cellulaires.

### **Pluripotence des ES et des EG**

Les cellules ES, dont plusieurs laboratoires ont démontré qu'elles étaient pluripotentes, peuvent proliférer pendant 2 ans à travers 300 ou même 450 doublements de population. Pour les cellules humaines il n'a pas été démontré qu'injectées dans un embryon elles sont capables comme chez l'animal de produire des cellules des deux lignées : génétique et somatique.

## Comparaison entre ES et EG humaines.

Les cellules ES de Thomson et les cellules EG de Gearhart sont similaires dans beaucoup d'aspects. Les deux types se repliquent pour des périodes étendues, ne montrent pas d'anomalies chromosomiques, génèrent des cultures cellulaires XX et XY et expriment un lot de marqueurs considérés comme caractéristique des cellules pluripotentes. Dans des conditions de culture appropriées les cellules ES et EG se différencient en cellules des trois types : endoderme, mésoderme, ectoderme.

Cependant les cellules ES et EG diffèrent dans leurs caractéristiques de croissance : les cellules ES ont pu se multiplier approximativement pendant 2 ans en doublant plusieurs centaines de fois leur population alors que les cellules EG n'ont pu fournir que 70 à 80 doublements de leur population. Les cellules ES ont générés des tératomes comportant les différents types de cellules différenciées alors que les cellules EG ne l'ont pas fait.

Récemment les chercheurs de Geron Co ont rapporté qu'ils avaient fait croître des cellules ES sans couche nourricière dans des milieux conditionnés avec MEF et supplémentés avec du FGF.

Un tableau (3.1) présente la comparaison entre cellules souches pluripotentes ES et EG chez l'homme, le singe et la souris.

## Utilisation potentielle des cellules souches embryonnaires

La liste des maladies qui pourraient être traitées par des cellules souches comprend : la maladie de Parkinson, les diabètes, les traumatismes de la moelle épinière, la dégénérescence des cellules de Purkinje, **la dystrophie musculaire de Duchenne**, l'insuffisance cardiaque, l'ostéogénèse imparfaite. L'avantage des cellules embryonnaires sur les cellules adultes est leur capacité proliférative illimitée et, sans doute, de générer un plus large choix de cellules différenciées. Le désavantage est le risque d'induire la formation de tumeurs qui pourrait être évité par l'insertion de gènes suicides quand ces cellules deviennent tumorigènes. Les cellules ES pourraient aussi éviter les rejets immunitaires mais le statut immunologique des cellules ES n'a pas encore été étudié en détail. On a suggéré de traiter les cellules avant leur transplantation par transfert de gène. La transplantation d'un noyau du receveur dans un ovocyte puis sa culture pour obtenir un blastocyste serait une autre solution (*clonage thérapeutique*)

## Autres potentialités des cellules souches :

- étude des premiers stades de l'embryologie humaine pour éviter les causes d'avortement
- étude de l'effet des anomalies chromosomiques dans les premiers stades de l'embryologie
- test de molécules thérapeutiques, de toxines
- développement de nouvelles méthodes de génie génétique (recombinaison homologue)

## Ce que nous savons et ce que nous ne savons pas sur les cellules souches

**Nous savons** que les cellules souches peuvent être cultivées en conservant un caryotype normal et qu'elles sont pluripotentes

### Nous ne savons pas :

- les mécanismes qui permettent la prolifération des cellules souches sans différenciation ;
- les modifications dans la méthylation de gènes contrôlant le développement observées chez la souris ne sont pas connues chez l'homme. Quelles catégories de type cellulaire peuvent dériver des cellules ES ?
- si les cellules souches humaines qui apparaissent homogènes et indifférenciées le sont vraiment et quels facteurs affectent leur différenciation ;
- les signaux de transduction qui doivent être activés pour induire la différenciation ;
- identifier les stades intermédiaires de la différenciation.

Finalement on a besoin de connaître les stades de différenciation optimaux pour des applications thérapeutiques.

## 4 La cellule souche de l'adulte

### Qu'est-ce qu'une cellule souche adulte ?

Les cellules souches adultes présentent au moins deux caractères :

- elles peuvent fournir des copies identiques à elles même pendant de longues périodes
- elles peuvent donner naissance à des cellules matures qui ont des caractères morphologiques et des fonctions spécialisées.

Les cellules souches adultes sont rares ( 1/10 000 à 1/15 000 dans la moelle osseuse est une cellule souche hématopoïétique).

On ne connaît pas l'origine des cellules souches adultes des chercheurs ont proposé qu'elles représentaient des cellules fœtales demeurées non différenciées. Beaucoup d'information provient des études de la souris. La liste des tissus contenant des cellules souches s'accroît, elle comprend : la moelle osseuse, le sang périphérique, le cerveau, la moelle épinière, la pulpe dentaire, les vaisseaux sanguins, le muscle squelettique, les épithéliums de la peau et du système digestif, la cornée, la rétine, le foie et le pancréas.

Idéalement une cellule souche adulte devrait être clonable, et donner naissance aux lignées cellulaires identiques à celles du tissu dont elle provient. Elle pourrait aussi être capable de donner naissance aux cellules différenciées matures avec leurs phénotypes caractéristiques.

### Plasticité des cellules souches adultes :

Démonstration de la plasticité des cellules souches adultes

La démonstration qu'une population de cellules souches adultes existe dans un tissu différencié exige que ces cellules s'auto-renouvellent et qu'elles donnent naissance à des cellules différenciées caractéristiques du tissu dans lequel elle sont implantées. Les travaux ont été généralement effectués chez la souris. Des cellules souches adultes d'un tissu différencié peuvent donner naissance à des cellules du même feuillet embryonnaire ou même d'autres feuillets embryonnaires.

Beaucoup d'études tendant à démontrer la plasticité ont été faites sur des cellules de la moelle osseuse ou du cerveau. Les cellules souches adultes sont mieux caractérisées dans ces deux tissus. Les études sur la plasticité suggèrent que des populations de cellules souches chez les mammifères adultes ne sont pas des entités fixes mais peuvent peupler d'autres tissus et se différencier en d'autres types cellulaires.

Il n'est pas possible de dire encore si la plasticité apparaît normalement *in vivo* et il n'est pas encore clair que le phénomène puisse être utilisé pour une transplantation thérapeutique.

### Preuves expérimentales de la plasticité des cellules souches adultes

#### Systeme nerveux :

Dans les 5 dernières années une série de travaux ont montré que le cerveau mammalien adulte contient des cellules souches qui peuvent générer les trois lignées cellulaires : astrocytes, oligodendrocytes et neurones. Trois groupes de cellules souches ont été rapportés dans le cerveau adulte des rongeurs et des preuves préliminaires existent pour le cerveau humain. Un premier groupe occupe la région ventriculaire et sous ventriculaire, un deuxième groupe décrit chez la souris mais pas chez l'homme se situe au contact du ventricule latéral et du bulbe olfactif, une troisième localisation chez la souris et chez l'homme se situerait dans l'hippocampe.

**Cellules souches de la zone sous-ventriculaire :** Les cellules de cette zone sont hétérogènes elles comportent des neuroblastes (neurones immatures) et des cellules de type astrocytaire contenant la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP). Ces cellules génèrent aussi *in vivo* des neurones mais le caractère de cellule souche de ces cellules est contesté. Des travaux *in vitro* ont permis cependant d'obtenir à partir des neurosphères qu'elles forment les trois types majeurs de cellules du SNC en utilisant des facteurs de croissance adéquats

**Cellules souches de la zone ventriculaire :** Ces cellules souches sont les cellules épendymaires ciliées qui bordent les ventricules latéraux. Par des expériences de marquage de ces cellules on a pu établir qu'elles étaient réellement des cellules souches fournissant des neurones après avoir migré dans le bulbe olfactif. Les marqueurs neuronaux  $\beta$ -III tubuline et Map2 ont permis d'établir qu'i s'agissait bien de neurones. D'autres expériences ont montré leur capacité à se diviser *in vivo*. Ces données suggèrent que les cellules épendymaires du SNC des rongeurs fonctionnent comme cellules souches et

elles peuvent être activées *in vitro* par des agents mitogènes et *in vivo* en réponse à des lésions. Après lésions les cellules épendymaires de la moelle épinière ne donnent que des astrocytes .

L'étude par microarrays des gènes exprimés par les cellules épendymaires d'une part et par les cellules sous-ventriculaires d'autre part montrent qu'il ne s'agit pas de la même population cellulaire.

**Cellules souches de l'hippocampe :** Les marquages par le bromure d'uridine a permis d'établir que chez la souris et chez l'homme les cellules de la zone subgranulaire du gyrus dentatus peuvent donner des neurones et des cellules gliales. Des observations, sur du matériel d'autopsie de patients traités par le Brd-U, ont montré que chez l'homme la formation de nouveaux neurones se poursuit tard dans la vie.

**Cellules souches du SNC fœtal :** Les cellules souches humaines dérivées de fœtus jeunes (10,5 semaines après la conception) peuvent être maintenues *in vitro* pendant de longues périodes (plus de 2 ans) dans un état indifférencié et se transformer dans les trois lignées du SNC sous l'effet de facteurs spécifiques et être greffées chez le rat.

**Cellules souches de la crête neurale :** Les cellules de la crête neurale forment les cellules du système sympathique et parasympathique ainsi que divers tissus non-neuraux. Ces cellules possèdent les caractéristiques de cellules souches. Des études récentes ont montré que ces cellules souches subsistent tardivement durant la gestation et on pu être isolées du nerf sciatique du rat au stade E14.5. Transplantées chez l'embryon de poulet ces cellules se développent en neurones et cellules gliales.

### Cellules souches de la moelle osseuse et du sang :

La moelle osseuse contient 3 types de populations cellulaires : les cellules souches hématopoïétiques, les cellules stromales et probablement des cellules progénitrices de l'endothélium.

**Cellules souches hématopoïétiques ( HSC ) :** Ces cellules peuvent donner naissance à toutes les cellules sanguines au cours de la vie. Plusieurs marqueurs de surface ont été utilisés pour identifier, pour isoler et pour purifier les HSC. Deux catégories de HSC ont été identifiées : les cellules de long terme qui prolifèrent durant toute la vie de l'animal 8 à 10% de ces cellules se divisent chaque jour, elles possèdent un haut niveau d'activité télomérasique et les HSC de court terme qui ne prolifèrent que durant quelques mois et se différencient en précurseurs myéloïdes et lymphoïdes. Des études récentes ont montré que ces HSC de court terme constituent une population hétérogène. Beaucoup de travaux ont été effectués pour obtenir la prolifération *in vitro* se sont des cytokines comme le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ) et l'interleukine -3 qui ont été le plus étudiées.

**Cellules stromales de la moelle osseuse :** En dehors de leur rôle dans la différenciation des cellules sanguines matures, les cellules stromales en fonction des conditions physiques de leur environnement peuvent générer du cartilage, de l'os et de la graisse. Les cellules stromales ont des caractères différents des HSC et sont aisément séparables *in vitro*, cependant il n'a pas encore été possible d'isoler une population pure de cellules stromales malgré l'utilisation de marqueurs comme les récepteurs pour les cytokines (interleukines 1,3,4,6 et7) ou ceux des protéines de la matrice extracellulaire ( ICAN-1 et 2, VCAM-1, intégrines \_ 1,2 et 3 etc ). L'origine et l'identité des cellules stromales restent discutés . Elles naissent du mésoderme embryonnaire durant le développement . Une théorie soutient que leur origine est commune au cellules progénitrices qui donnent naissance à la fois aux HCS et aux précurseurs mésodermiques.

### Cellules souches dans d'autres tissus

**Cellules progénitrices de l'endothélium :** Les hémangioblastes, dérivés du mésoderme, sont les précurseurs des lignées hématopoïétiques et des cellules endothéliales. Les hémangioblastes n'ont pas pu encore être isolés de l'embryon, leur existence a été découverte par l'étude de l'embryogénèse de la souris qui a montré que, des cellules dérivées des cellules ES exprimées Flk-1 qui est le récepteur du VEGF (vascular endothelial growth factor). La moelle osseuse contient des cellules, capables de donner de nouveaux vaisseaux dans les tissus ischémiés, qui ressemblent aux hémangioblastes. Des cellules humaines de ce type injectées dans les veines d'un rat, présentant une ischémie cardiaque, génèrent de nouveaux vaisseaux dans le cœur ischémié. Ces cellules, à destinée endothéliale, sont CD34<sup>+</sup> et expriment le facteur de transcription GATA-2. Des cellules progénitrices de l'endothélium ont été isolées du sang périphérique chez des mammifères adultes en utilisant des anticorps dirigés contre CD34 et Flk-1 elles prennent en culture une forme en fuseau et forment des structures tubulaires .

**Cellules souches du muscle :** trois types de cellules souches du muscle ont été identifiées :

- les cellules satellites
- les cellules de la paroi de l'aorte dorsale

- les cellules de la « side population »

Les cellules satellites, connues depuis 40 ans chez les mammifères, qui normalement ne se divisent pas, peuvent proliférer à la suite d'une lésion ou de l'exercice. Ces cellules donnent alors naissance à des cellules précurseurs myogéniques qui se différencient en myofibrilles sous l'action de facteurs de régulation : MRFs, MyoD et Myf5.

Une publication récente (De Angelis et al (=groupe Cossu) J Cell Biol 147 : 869-877) a montré que des cellules de l'aorte dorsale de l'embryon de souris peuvent donner des cellules satellites et des cellules endothéliales.

Une autre publication (Gussoni (=groupe Mulligan) et al Nature 401 : 390-394) a montré que des cellules d'une population séparées par analyse de fluorescence (side population) pouvait quand elles étaient injectées en intraveineuse restaurer l'expression de la dystrophine chez la souris mdx, cependant à un niveau trop faible pour atteindre un bénéfice clinique.

Ainsi des cellules souches ou des cellules d'un type progéniteur provenant de tissus dérivés du mésoderme sont capables de générer du muscle squelettique.

### **Cellules épithéliales précurseurs dans la peau et le système digestif.**

Les cellules épithéliales dans la peau et le tractus digestif sont remplacées constamment. Les cellules cryptiques de l'intestin sont considérées comme des cellules souches.

La peau des mammifères contient au moins trois populations de cellules épithéliales : les cellules épidermiques, les cellules du follicule pileux et les cellules des glandes sudoripares . Dans chacune de ces populations des cellules souches sont postulées. La région du follicule pileux semble donner naissance à plusieurs types cellulaires. Une autre population de cellules souches apparaît dans la couche basale de l'épiderme . Les cellules souches peuvent être distinguées par le haut niveau d'expression de la  $\alpha_1$  intégrine. La  $\alpha_1$ -caténine aide à maintenir l'état de cellule souche et la voie qui donne naissance à l'amplification est régulée par l'oncogène c-Myc.

### **Cellules souches du pancréas et du foie.**

Ces tissus sont d'origine endodermique, une étude récente montre qu'une cellule précurseur, dérivée de l'endoderme embryonnaire, peut générer à la fois le pancréas ventral et le foie. Les cellules souches du pancréas adulte sont postulées apparaître dans les canaux pancréatiques ou dans les îlots de Langerhans, ces cellules expriment la nestine qui est habituellement connue comme marqueur neuronal . De récents travaux chez les rongeurs ont montré que les HSC sont capables de coloniser le foie après lésion et deviennent des hépatocytes. La question demeure de savoir si ces cellules de la moelle osseuse peuvent générer *in vivo* des hépatocytes. Les cellules ovales hépatiques peuvent provenir du système porte dans le foie et donner des hépatocytes. Les hépatocytes eux-mêmes peuvent être responsables de la régénération du foie.

### **Que savons nous sur les cellules souches adultes ?**

Des cellules souches de l'adulte peuvent proliférer sans se différencier pendant de longues périodes et peuvent donner naissance à des types cellulaires matures ;

des cellules souches adultes ont la capacité de se différencier dans des tissus autres que ceux dont elles sont originaires ;

des cellules souches adultes ont été dérivées du cerveau, de la moelle osseuse, de la pulpe dentaire, de la moelle épinière, des vaisseaux sanguins, du muscle squelettique, de l'épithélium de la peau et du système digestif de la cornée, du foie et du pancréas

les cellules souches hématopoïétiques sont les plus étudiées et utilisées en clinique . Il y a au moins deux autres populations de cellules souches adultes identifiées à partir de la moelle osseuse et du sang ;

plusieurs populations de cellules souches adultes ont été identifiées dans le cerveau, leur prolifération et leur différenciation sont influencées par divers facteurs de croissance ;

il y a d'autres cellules souches dans d'autres tissus qui démontrent leur plasticité . Mais il y a un petit nombre de travaux démontrant cette plasticité ;

rarement on a démontré que les cellules souches adultes peuvent générer des cellules matures pleinement fonctionnelles.

## Qu' avons nous besoin de savoir sur les cellules souches adultes ?

quelles sont les sources de cellules souches adultes, pourquoi restent elles dans un état indifférencié alors que les cellules qui les entourent sont différenciées ?

est-il possible de manipuler les cellules souches adultes pour augmenter leurs capacités prolifératives *in vitro* ?

combien de sortes de cellules souches adultes existent et dans quels tissus ?

quelle est la meilleure évidence que les cellules souches adultes montrent une plasticité et génèrent des types cellulaires d'autres tissus ?

est-il possible de manipuler les cellules souches adultes pour augmenter leur prolifération ?

y-a-t'il une cellule souche universelle ?

les cellules souches adultes montrent-elles une plasticité *in vivo* ? Si oui est-ce vrai de toute cellule souche adulte ? Quels sont les signaux qui régulent la prolifération et la différenciation des cellules souches ?

## 5 Cellules souches hématopoïétiques

### Qu'est-ce qu'une cellule hématopoïétique ?

Une cellule hématopoïétique est une cellule isolée du sang ou de la moelle osseuse qui peut se renouveler et peut se différencier en une variété de cellules spécialisées et qui peut être mobilisée hors de la moelle, dans le sang circulant. Une cellule sur 10 à 15 000 de la moelle peut être une cellule souche, dans le sang seulement une sur 100 000.

Des études ont révélé qu'il y avait deux catégories de cellules souches dans la moelle osseuse :

- des cellules souches à long-terme capables de s'auto-renouveler
- des cellules souches à court-terme ou cellules précurseurs incapables de s'auto- renouveler dans des conditions normales et ne pouvant fournir qu'un type de cellule sanguine : des globules rouges par exemple.

Le problème central de ces cellules est qu'elles sont difficiles à faire se multiplier en culture

### Quels marqueurs peuvent être utilisés pour identifier les cellules souches hématopoïétiques ?

Marqueurs de surface proposés par I. Weissman et pouvant être marqués par des anticorps monoclonaux

#### Souris

CD34<sup>low/-</sup>

SCA-1<sup>+</sup>

Thy1<sup>+/low</sup>

CD38<sup>+</sup>

C-kit<sup>+</sup>

Lin<sup>-</sup>

#### Homme

CD34<sup>+</sup>

CD59<sup>+</sup>

Thy1<sup>+</sup>

CD38<sup>loww/-</sup>

C-kit<sup>-/low</sup>

lin<sup>-</sup>

Après marquage ces groupes de cellules apparaissent hétérogènes, certaines ne sont pas des cellules souches et des chercheurs ne sont pas d'accord avec la valeur de ces marqueurs

### Quelles sont les sources de cellules souches hématopoïétiques ?

**Moelle osseuse** : source la plus classique. Une cellule sur 100 000 est une cellule souche de « long-terme ».

**Sang périphérique** : Des cellules souches du sang périphérique sont utilisées en clinique pour restaurer le système immunitaire de patients par autogreffe. Les cellules souches sélectionnées par le marqueur CD34<sup>+</sup> sont en fait un mélange de cellules.

**Cordon ombilical** : Le cordon ombilical et le placenta sont une riche source de HSC et il a été suggéré que le cordon ombilical contient des cellules souches multipotentes (endodermiques, mésodermiques et ectodermiques) mais il n'y a pas encore de données scientifiques publiées pour supporter cette opinion.

**Système hématopoïétique fœtal :** Chez la souris au 7<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire une activité hématopoïétique apparaît dans des îlots sanguins du sac vitellin qui ne sont probablement pas la majorité des HSC de l'adulte. Une deuxième vague à 10-11 jours de développement de cellules HSC apparaît plus tardivement dans la région AGM (aorte gonades et mesonéphros) ces cellules pouvant aussi fournir des cellules endothéliales, ceci correspondant à la 4<sup>ème</sup> - 6<sup>ème</sup> semaine de gestation humaine. Coulombel et Peault ont décrit les précurseurs hématopoïétiques dans l'embryon humain en 1995-96.

**Cellules souches embryonnaires et cellules germinales embryonnaires :** Les cellules souches embryonnaires de la souris en culture, avec des facteurs de croissance adéquats, peuvent donner beaucoup, sinon tous, les types cellulaires sanguins.

Les cellules souches embryonnaires germinales, cultivées dans certaines conditions produisent des cellules CD34<sup>+</sup> mais qui n'ont pas été rigoureusement testées pour vérifier leur capacité de se renouveler à long terme et donner naissance aux différentes cellules du sang.

### En quoi les HSC de sources variées diffèrent ?

Les HSC prises sur les tissus des stades embryonnaires précoces ont une plus grande capacité : à se repliquer, au « homing » et sont moins rejetées par le système immunitaire.

- **Les cellules souches de la moelle osseuse :** c'est un problème controversé de savoir si la qualité de ces cellules décroît avec l'âge.

- **L'efficacité de la transplantation des cellules souches du cordon ombilical .** Il est difficile d'extraire du placenta et du cordon ombilical plus de quelques millions d'HSC et il faut 7 à 10 millions de cellules CD34<sup>+</sup> par kg du poids du corps pour une transplantation efficace. Mais une réaction de la greffe contre l'hôte (GVH) serait moindre avec des cellules du cordon et au moins chez la souris elles auraient une meilleure capacité proliférative.

Efficacité des transplants de cellules souches du sang périphérique : plus faciles à collecter et plus rapides à greffer mais provoquent plus de réaction GVH.

### Quelles sont les actions des HSC et quels facteurs sont impliqués dans leurs activités ?

Les HSC de la moelle osseuse : peuvent s'auto- renouveler, se différencier, passer dans la circulation et présenter une apoptose.

En culture les HSC de la moelle osseuse, ou du sang, voient leur nombre s'accroître mais il y a une augmentation des cellules différenciées. L'hypothèse est que le déclin de l'auto- renouvellement des cellules souches est associé au déclin de l'activité télomérasique.

Deux progrès ont été introduits dans la culture des HSC : deux cytokines (stem cell factor et thrombopoïétine) améliorent le potentiel d'auto-renouvellement et l'activation de gp130 ( une molécule de signalisation) qui est critique pour la survie et la prolifération chez la souris.

Avec des cytokines spécifiques et des molécules de signalisation on a obtenu une augmentation de 20 fois dans la culture à long terme. En utilisant des cellules de la région AGM une augmentation de 15 fois des HSC a été obtenue. Des cultures d' une lignée cellulaire de cellules dérivées du stroma ont pu être maintenues 4 à 7 semaines, mais on ignore le facteur sécrété par les cellules stromales qui maintiennent ainsi les cellules souches. De même des molécules d'adhésion du stroma interviennent dans la mobilisation et l'attachement des cellules. Les signaux qui déclenchent l'apoptose des HSC sont aussi inconnus, ce qui serait important de connaître pour accroître leur nombre en culture.

### Quels sont les usages cliniques des HSC ?

**Leucémie et lymphome :** les premiers essais cliniques ont été réalisés par injection de HSC provenant du sang périphérique d'un donneur compétent après destruction par chimiothérapie ou irradiation. Le 10 mai 2001 la FDA a approuvé un nouveau produit le Gleevec (imatinibe mesylate) qui cible une protéine mutante produit par les cellules cancéreuses des leucémies myélogéniques chroniques et empêche leur multiplication ce qui permettrait de ne pas recourir aux transplantations de moelle, mais on ne sait pas si la rémission obtenue avec ce produit prolonge la vie des patients.

**Maladies du sang héréditaires.** Les transplantations de moelle sont aussi utilisées dans le traitement des maladies héréditaires comme certaines anémies, la  $\alpha$ -thalassémie le syndrome de Blackfan-Diamond, la leucodystrophie à cellules globoïdes, la drépanocytose, le syndrome de Wiskoff-Aladrich, les syndromes de Hunter, de Hurler, de Lesch Nyhan et l'ostéopétrose mais en raison des dangers du traitement ceci est utilisé en dernier ressort.

**HSC dans le chimiothérapie du cancer** Les chimiothérapies ont pour but d'empêcher la multiplication des cellules cancéreuses mais elles empêchent aussi la division des cellules HSC, aussi le prélèvement des HSC du patient avant la chimiothérapie et leur réinjection après le traitement est utilisé, le danger restant de réintroduire des cellules cancéreuses. Des chercheurs ont montré que l'on peut éviter cela en purifiant les HSC et en ne réinjectant que celles qui sont CD34<sup>+</sup> Thy-1<sup>+</sup>.

**Traitement des tumeurs par la réaction du greffon vers la tumeur.** Le traitement du cancer métastatique du rein a d'abord été traité par cette voie, puis le protocole a été étendu à d'autres tumeurs solides. On procède à une greffe allogénique d'HSC d'un donneur compétent et le système immunitaire du patient est partiellement détruit. Après 2 ou 3 mois le DNA des cellules immunitaires du patient sont vérifiées par fingerprint pour suivre la croissance des propres cellules du patient.

Des études *in vitro* ont montré que les cellules souches du cordon ombilical et du sang périphérique avaient une activité anti-tumorale qui pouvait être augmentée avec les cytokines IL-15.

**Autres applications des HSC.** Les premières applications sont les maladies autoimmunes (diabète, polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux) et consistent à voir si le système immunitaire peut être reconstitué ou reprogrammé.

## Plasticité des HSC

Ce concept a été traité dans le chapitre 4. Les cellules de la moelle osseuse ont été utilisées pour le muscle cardiaque et squelettique ou le foie. Bittner et al ont utilisé des cellules de la moelle provenant d'un mâle sain à une femelle mdx. Après 70 jours, les cellules du mâle étaient retrouvées dans les muscles de la femelle traitée. Lagasse et al ont aussi démontré que le foie pouvait être réparé par des HSC purifiées. Krause et al ont montré que chez la souris les cellules HSC du donneur pouvait être retrouvées dans les poumons, l'intestin et la peau du receveur

## Quelles sont les barrières au développement des nouveaux traitements utilisant les HSC ?

**Accroître le nombre des HSC.** Ceci est un problème fondamental pour assurer l'efficacité d'un traitement. L'analyse des facteurs permettant la multiplication a permis d'accroître de 20 fois le nombre des cellules souches à long terme, bien que brièvement, en culture. Les cellules progénitrices pour les granulocytes et les macrophages ont pu être augmentées de 278 fois en culture. Les augmentations dans le nombre de cellules ne sont pas maintenues sur de longues périodes et les cellules ne sont pas toujours bien caractérisées quant à leur capacité à être modifiées par thérapie génique, leur longévité potentielle, leur immunogénicité, leur capacité de homing et leur susceptibilité à une transformation cancéreuse. Certains scientifiques pensent que l'on peut traiter les cellules pour être utilisées dans un but clinique.

**Ruser le système immunitaire de l'hôte, greffe et attaques pathogènes.** Les risques des transplantations de moelle osseuse sont : la réjection du greffon, la réaction greffon vers l'hôte (HVG) et les infections, ce qui réduit son usage à des maladies fatales. La manipulation du système immunitaire et la protection contre les pathogènes commencent à fonctionner. L'identification de sous-populations de cellules T permettrait aux cliniciens de faire des greffes avec plus de sécurité et d'éviter les réactions GVH. La compréhension de la présentation des antigènes et des réactions immunitaires est cruciale. Le remplacement d'une partie des cellules qui aboutiraient à un mixage serait peut être suffisant et éviterait les effets secondaires.

**Comprendre l'environnement de la différenciation et la plasticité développementale.** : A un certain moment du développement toutes les cellules sont plastiques. Quel est l'environnement embryonnaire qui fournit aux cellules les instructions nécessaires ? La plasticité peut réfléchir la dérivation à partir du mésoderme. Un laboratoire (Zon L I) étudie les cellules embryonnaires adjacentes et comment l'embryon reçoit l'information pour fabriquer un tissu et pas un autre.

Les études *in vivo* de la plasticité des HSC sont encore dans l'enfance et même si les études confirment la plasticité chez la souris ceci ne sera pas obligatoirement vrai chez l'homme.

**En résumé** l'étude des HSC depuis un demi siècle est un des domaines les plus avancés en biomédecine. Les questions clés sur le potentiel des HSC pour assurer leur expansion en toute sécurité et les connaissances en immunité sur la réjection et le GVH sont des questions fondamentales à résoudre.

Une base de données sur les cellules souches existe sur le site <http://stencell.princeton.edu>

## **6 Maladies autoimmunes et promesses des thérapies basées sur les cellules souches**

Les maladies autoimmunes comme le diabète de Type 1, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux, la sclérose en plaques, le syndrome de Sjogren et la maladie inflammatoire de l'intestin sont dues à des erreurs du système immunitaire qui attaque ses propres cellules.

Comment le système immunitaire, normalement, nous garde en bonne santé ?

Quand un individu est infecté, le corps réagit en activant une variété de cellules immunitaires. Les bactéries ou virus sont englouties par des cellules présentant l'antigène (APC) les protéines composant l'antigène sont coupées en morceaux et réparties à la surface de la cellule, les antigènes se lient au complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) ou molécules HLA (human leucocyte antigen) à la surface des APC. Ce complexe, formé d'une protéine étrangère et d'une protéine MHC, se lie à un récepteur d'une cellule T, à la surface d'une cellule immune CD4 helper. Ce complexe des cellules T focalise la réponse immune spécifique à l'organisme envahisseur. Les cellules T CD4 helper se divisent et sécrètent des cytokines qui causent une inflammation et active d'autres cellules immunitaires. Ces cytokines sécrétées par les cellules T agissent sur des cellules T CD8 cytotoxiques. Les cellules T peuvent aussi activer les cellules B qui produisent des anticorps neutralisant et éliminant bactéries et virus. Certaines cellules B et T activées deviennent des cellules de mémoire à long terme.

### **Comment font les cellules de l'immunité pour reconnaître et attaquer ou non ?**

Les cellules T subissent dans le thymus un processus d'éducation qui leur permet de distinguer entre le soi et le non soi. Les cellules T ont la capacité de se lier à des protéines particulières du système MHC exprimées par l'individu ce qui est à la base de la réponse immunitaire quand un organe transplanté est rejeté. Habituellement les cellules T n'attaquent pas les autoantigènes du corps. La maladie autoimmune provient de la destruction par des cellules cytotoxiques T CD8 des cellules d'un tissu, accompagnée par un phénomène inflammatoire.

### **Les cellules souches hématopoïétiques pour les maladies autoimmunes.**

La maladie auto-immune peut être spécifique d'un organe, par exemple : la destruction des cellules des îlots pancréatiques dans le cas du diabète de type 1. Ces maladies peuvent être traitées par le remplacement, ou la réparation des cellules endommagées ou détruites. (Cf chapitre 7). Au contraire les maladies auto-immunes non spécifiques d'un organe comme le lupus, caractérisées par des réactions immunitaires contre différents organes et tissus, n'offrent pas de cibles spécifiques, et l'objectif est de détruire le système immunitaire et de générer un nouveau système immunitaire. Des essais cliniques autologues consistant à retirer les cellules souches hématopoïétiques, à les purifier, puis à les réinjecter après que le patient ait subi un traitement cytotoxique. Des patients ont été traités à long terme (3 ans) pour un lupus sans nécessité de traitement immunosuppresseur prouvant que le remplacement des cellules souches peut être bénéfique.

### **Développement de lignées d'HSC pour la transplantation.**

Les cellules souches provenant du sang du cordon ou de la moelle osseuse ont un potentiel d'auto-renouvellement plus limité que les cellules souches embryonnaires. Pour les maladies auto-immunes les cellules embryonnaires provenant de banques exprimant différentes combinaisons des trois facteurs les plus critiques du système MHC pourraient être générées. Il pourrait aussi être possible d'introduire des protéines du récepteur MHC dans les cellules embryonnaires ou de générer une lignée de donneur universel de cellules embryonnaires par altération génétique ou retrait des protéines MHC. Ce qui a été réalisé chez la souris mais exige d'être vérifié chez l'homme.

Un autre avantage potentiel d'utiliser des cellules souches de populations pures serait d'éviter la réaction GVH.

## **Thérapie génique et approche par cellules souches pour le traitement des maladies autoimmunes.**

La thérapie génique des maladies auto-immunes repose sur deux stratégies :

- blocage de l'action d'une cytokine inflammatoire en transférant dans les cellules un gène codant pour un récepteur «piège» de cette cytokine
- transfert d'un gène codant pour une cytokine anti-inflammatoire ce qui dirige la réponse inflammatoire vers un état plus tolérant.

Les difficultés de ces stratégies résident dans le transfert de gène dans des cellules adultes, dans la lenteur des divisions et aussi dans l'obtention d'une expression à long terme. Les cellules souches sont plus permissives pour le transfert de gènes et maintiennent l'expression au cours de leur auto-renouvellement. Des cellules souches embryonnaires ou de l'adulte pourraient par exemple être modifiées avant ou durant la différenciation en cellules des îlots pancréatiques et ensuite transplantées. Des chercheurs ont dirigés la différenciation de cellules dendritiques à partir de cellules souches embryonnaires de souris. Ces cellules dendritiques pourraient être utilisées contre la polyarthrite rhumatoïde.

Les cellules souches embryonnaires génétiquement modifiées pourraient fournir des cellules du tissu conjonctif et offrir une alternative aux cellules stromales de la moelle pour la réparation du cartilage

Les thérapies utilisant des cellules souches offrent la possibilité de nouveaux traitements pour les maladies autoimmunes.

## **7 Cellules souches et diabète**

Depuis des décennies les scientifiques ont cherché à remplacer les cellules produisant l'insuline dans le pancréas pour lutter contre le diabète qui est la septième cause de mort aux USA . Le diabète de type 1 résulte de la destruction des cellules qui produisent l'insuline par le système immunitaire , le diabète de type 2 est causé par l'incapacité d'utiliser l'insuline. Dans les deux cas on observe un accroissement du glucose dans le sang.

Chaque année 1300 personnes atteintes de diabète de type 1 reçoivent une greffe de pancréas et 83% n'ont pas après de symptômes de diabète. Mais il y a une pénurie de donneurs et le traitement immunosuppresseur rend les malade susceptibles à toutes les infections .

Des greffes d'îlots pancréatiques sont aussi pratiquées mais le traitement par les stéroïdes immunosuppresseurs augmente la demande métabolique des cellules produisant l'insuline et épuise leur capacité. Un nouveau traitement développé au Canada utilisant un plus grand nombre d'îlots greffés et d'autres immunosuppresseurs normalise la production d'insuline. Un test dans 10 centres dans le monde est actuellement en cours. Si ce protocole est dupliqué il restera : la difficulté d'avoir suffisamment d'îlots à transplanter, leur compatibilité immunologique avec le receveur et les risques d'infections à surmonter.

### **Développement du pancréas**

Le pancréas se développe à partir du duodénum et les cellules des îlots semblent avoir leur origine dans les canaux pancréatiques. Une controverse existe pour savoir si des cellules souches adultes existent dans le pancréas. Plusieurs études prometteuses indiquent que des cellules produisant de l'insuline peuvent être cultivées à partir des lignées de cellules souches embryonnaires.

### **Développement de thérapies cellulaires pour les diabètes.**

Pour le diabète il n'est pas certain qu'il soit seulement nécessaire de produire des cellules b ou si d'autres types de cellules pancréatiques sont aussi nécessaires. Plusieurs chercheurs pensent qu'il serait préférable de développer un système produisant tous les types de cellules contenus dans les îlots de Langherans.

### **Tissu fœtal comme source de cellules des îlots.**

De différentes expériences les chercheurs ont conclu que les cellules précurseurs dans les îlots cultivés étaient capables de proliférer et de se différencier, mais que les cellules déjà différenciées ne pouvaient pas proliférer quand elles étaient greffées.

### **Le tissu adulte comme source de cellules des îlots.**

Des chercheurs ont réussi par addition de gènes à des cellules d'îlots, prélevés sur des cadavres, à stimuler la prolifération. Mais les cellules doivent être encore modifiées pour stimuler la production d'insuline. Le problème reste de maintenir un équilibre entre croissance et différenciation. Les cellules qui prolifèrent bien ne produisant pas efficacement d'insuline et les cellules produisant de l'insuline ne prolifèrent pas.

Une autre source de cellules progénitrices se trouverait dans les canaux pancréatiques et des travaux ont montré que des cellules isolées des canaux pancréatiques humains pouvaient sécréter de l'insuline, mais il n'a pas pu être établi que ces lignées cellulaires pouvaient croître indéfiniment. Pour le diabète de type 2 les patients pourraient bénéficier de la transplantation de cellules de leurs propres canaux, après expansion en culture, ils n'auraient alors pas besoin d'immunosupresseurs. D'après certains travaux des cellules dédifférenciées des canaux et des cellules progénitrices des îlots existeraient dans les canaux pancréatiques. Des reversions du diabète ont été obtenues, chez la souris par des greffes de ces cellules souches.

### **Cellules souches embryonnaires**

Plusieurs équipes ont recherché la possibilité que des cellules embryonnaires humaines puissent offrir un traitement pour le diabète. Des chercheurs espagnols ont ajouté du DNA contenant une partie du gène de l'insuline dans des cellules embryonnaires de souris qui en présence de faibles concentrations de glucose étaient capables de répondre à des changements de concentration de glucose, ils ont ensuite implanté ces cellules dans la rate de souris diabétiques et inversé ainsi les symptômes du diabète.

D'autres auteurs ont décrit des expériences dans lesquelles des cellules souches embryonnaires se transformaient en corps embryoïdes (agrégat de cellules contenant des cellules des trois feuillets embryonnaires) d'où ils ont sélectionné les cellules exprimant le marqueur neural nestine puis, par une méthode de culture sophistiquée, ils ont pu induire des îlots, ressemblant à ceux trouvés dans le pancréas natif, qui répondaient à une concentration de glucose par la sécrétion d'insuline. Plusieurs groupes de chercheurs essaient d'appliquer cette technique à des cellules souches embryonnaires humaines pour les différencier en îlots produisant de l'insuline. Des chercheurs israéliens ont manipulé en culture des cellules souches embryonnaires pour qu'elles expriment le gène *PDX-1* qui contrôle la transcription de l'insuline. Ils ont obtenu des corps embryoïdes qu'ils ont traités avec différents facteurs de croissance, ceux traités avec du NGF et ceux non traités exprimés *PDX-1*. Les mêmes auteurs ont montré que 1 à 3% des cellules des corps embryoïdes sont des cellules \_ produisant de l'insuline, ces cellules exprimaient aussi glut-2 et la glucokinase spécifique des îlots. L'ensemble de ces résultats indique que les cellules souches embryonnaires pouvaient se différencier en cellules produisant de l'insuline.

### **Directions futures**

Avant de traiter en clinique le diabète beaucoup de problèmes de sécurité doivent être résolus. Un problème majeur étant que les cellules souches transplantées puissent donner naissance à des tumeurs.

Avant que des cellules précurseurs des îlots puissent être utilisées en clinique, il faut développer une source renouvelable de cellules souches humaines. Les cellules embryonnaires montrent le plus de promesses dans ce sens mais beaucoup de chercheurs sont d'accord pour que soient explorées toutes les possibilités des cellules souches embryonnaires et de l'adulte.

## **8 Reconstruction du système nerveux avec des cellules souches**

Les cellules souches offrent de nouvelles stratégies pour le remplacement des neurones. Au milieu des années 90 les « neuroscientistes » découvraient, qu'au contraire de ce que l'on considérait comme un dogme, il existait des cellules souches neurales chez le fœtus comme dans le cerveau adulte. Deux stratégies fondamentales ont été conçues pour exploiter cette découverte. Une est de faire croître des cellules différenciées au laboratoire à partir de cellules neurales indifférenciées, une variété de cellules souches peuvent être utilisées.

L'autre approche consiste à trouver des facteurs trophiques pour déclencher des mécanismes de réparation endogènes

### **Approches multiples dans l'utilisation des cellules souches dans la recherche sur la maladie de Parkinson.**

Les neurones qui meurent dans la maladie de Parkinson connectent la substantia nigra au striatum. Ces neurones de la voie nigro-striatale libèrent de la dopamine qui régule les nerfs contrôlant les mouvements du corps. Personne ne sait pourquoi ces neurones meurent. Le traitement à la L-dopa qui initialement aide les patients provoque des effets secondaires qui augmentent avec le temps et son efficacité alors disparaît.

### **Transplants de tissu fœtal dans la recherche sur la maladie de Parkinson.**

Une première transplantation de cellules des glandes surrénales a été essayée en 1980. Des neurochirurgiens de Mexico ont transplanté des cellules chromaffines de plusieurs patients dans la zone nigro-striatale du cerveau. Le résultat parut modeste et les risques d'une double intervention surpassaient le bénéfice de la greffe. Bjorklund au début des années 80 a montré, chez le rat et le singe, que la greffe de tissu fœtal dans la région du cerveau atteint pouvait inverser les symptômes du Parkinson. Les premiers essais humains eurent lieu au milieu des années 80 en utilisant du tissu provenant de fœtus de 7 à 9 semaines. Les neurones greffés s'intégraient dans la zone du striatum. Une faiblesse de ces premiers essais était qu'ils étaient effectués en « ouvert » chercheurs et patients savaient quels étaient les patients greffés. Au milieu des années 90 le NIH approuvait deux essais rigoureux en double aveugle contre placebo. Les résultats d'un de ces essais ont été publiés récemment (en 2001), comparés au contrôle les patients transplantés ne montrent pas de bénéfice significatif sur la qualité de vie. Cette étude cependant apporte une importante information sur la capacité des neurones dopaminergiques à survivre chez l'homme, comme l'ont montré des données du PET et l'autopsie de deux patients décédés plusieurs mois après la chirurgie. Les résultats d'un second essai en double aveugle, qui diffère substantiellement du premier sont attendus.

Une alternative à cette procédure est d'utiliser des cellules provenant d'animaux un résultat préliminaire de greffes de cellules neurales de fœtus de porc montre que 18 mois après la greffe les patients traités ne montrent pas de différence significative avec les contrôles.

### **Collecte de neurones pour leur remplacement chez les patients atteints de maladie de Parkinson**

Les cellules dérivées de cellules souches pourraient être la meilleure alternative pour le matériel à transplanter. Une manière est de trouver la bonne combinaison de facteurs de croissance et de milieu de culture pour transformer des cellules indifférenciées en neurones sécrétant de la dopamine. Une autre possibilité est de placer des cellules moins différenciées et d'utiliser des signaux environnementaux dans le cerveau pour les conduire à une bonne catégorie de cellules de remplacement.

Les cellules souches neurales isolées de l'homme ou des animaux ne peuvent pas croître efficacement au laboratoire sans changer de caractéristiques. Les cellules souches embryonnaires, gardées en culture dans un état complètement indifférencié, sont capables de devenir non seulement des cellules nerveuses mais de tous les types cellulaires. Les cellules souches de la moelle osseuse ou du cordon ombilical peuvent être conditionnées pour présenter des marqueurs de surface caractéristiques des cellules nerveuses il n'est pas encore clair si ces cellules sont capables de donner naissance à des neurones fonctionnels.

L'an dernier R McKay a décrit une procédure pour convertir des cellules souches embryonnaires en neurones ayant les caractéristiques des neurones dopaminergiques et capables de former des synapses.

La compagnie Geron a testé le potentiel de cellules souches embryonnaires humaines sur des modèles animaux de Parkinson mais les résultats ne sont pas encore complets.

### **Mise en marche des cellules souches du cerveau comme mécanisme de réparation**

Une alternative est de trouver des médicaments qui aident les propres cellules souches du patient à réparer son cerveau.. On a étudié les effets d'une protéine : le TGF $\alpha$  (transforming growth factor ), un peptide naturel trouvé dans les premiers stades du développement embryonnaire qui intervient dans des processus normaux de réparation de plusieurs organes. . Le TGF $\alpha$ , injecté dans le cerveau de rats sains, cause la prolifération des cellules souches de la zone sous-ventriculaire. Si la même opération est effectuée chez des rats où le système nigro-striatal a été endommagé par une toxine (la 6 hydroxydopamine) Après plusieurs jours de prolifération, une vague de migration de cellules souches vers la voie endommagée, où elles se différencient en neurones dopaminergiques, apparaît et les rats ne montrent plus d'anomalies comportementales. On ne sait pas encore clairement si l'effet bénéfique vient de cellules néoformées ou de quelque effet trophique.

### **Rôle futur des cellules souches dans la réparation des lésions de la moelle épinière.**

La réparation des lésions de la moelle épinière où beaucoup de types cellulaires sont détruits est probablement pour un avenir lointain. Les patients pourraient bénéficier d'une restauration limitée de fonctions perdues. Dans beaucoup de lésions la moelle n'est pas coupée mais des éléments de la myéline comme les oligodendrocytes sont perdus. . On a montré que les cellules souches peuvent aider à la remyélinisation chez les rongeurs par injection d'oligodendrocytes dérivés des cellules souches embryonnaires. Les chercheurs estiment que beaucoup de recherches précliniques et fondamentales doivent encore être réalisées avant de passer à des essais cliniques. La recherche sur les cellules souches pour le système nerveux avance rapidement.

## **9 Les cellules souches peuvent-elles réparer un cœur endommagé ?**

Aux USA l'insuffisance cardiaque affecte 4,8 millions de personnes. La destruction des cardiomyocytes peut résulter de l'hypertension, de la maladie coronarienne ou d'une attaque cardiaque. Les cellules qui peuvent être utilisées sont : les cardiomyocytes, les cellules de l'endothélium vasculaire, et les cellules du muscle lisse de la paroi des vaisseaux. Les potentialités des cellules souches à se développer dans ces types cellulaires sont aujourd'hui explorées. Un travail récent a montré que les cardiomyocytes, après un infarctus, peuvent se diviser. Mais il n'y pas encore de preuves que le cœur contienne de vraies cellules souches. On sait aujourd'hui dans quelles conditions *in vitro* les cellules souches peuvent fournir des cardiomyocytes ou des cellules endothéliales.

Les travaux sont poursuivis sur la souris et le rat . On peut créer une attaque cardiaque chez la souris en ligaturant un des vaisseaux alimentant le muscle cardiaque. Des chercheurs ont isolés, grâce à des marqueurs de la surface cellulaire, des cellules de la moelle osseuse ayant la capacité de se développer en cellules de différents types. Injectées dans la paroi du ventricule ces cellules ont fourni : des cardiomyocytes, de l'endothélium vasculaire et du muscle lisse. Le myocarde neo-formé occupé 68% de la portion endommagée du ventricule 9 jours après la greffe. Les cellules injectées ont migré dans la région endommagée elles se sont multipliées et sont devenues des cellules spécialisées.

Dans une autre étude des cellules de la « side population », isolées de la moelle osseuse adulte, ont montré leurs capacités à donner des cardiomyocytes et des cellules endothéliales après avoir été injectées dans la moelle de souris irradiées.

Des travaux sur les cellules souches humaines, transplantées à des rats, ont montré leur capacité à se différencier en cellules de l'endothélium vasculaire.

Des chercheurs israéliens ont aussi démontré la possibilité d'obtenir des cardiomyocytes à partir des cellules des corps embryoïdes. Tous ces travaux montrent la possibilité des cellules souches de fournir des cellules de remplacement pour les affections cardiovasculaires, mais il faut encore vérifier que ces populations cellulaires ne comportent pas d'éléments qui pourraient provoquer le rejet des cellules greffées. Il reste aussi à résoudre le problème de la production d'un nombre suffisant de cellules pour avoir une efficacité physiologique. Il faut aussi savoir, pendant combien de temps les cellules greffées restent fonctionnelles. Dans le futur on peut envisager de préparer des cellules provenant de patients à

risque qui pourraient être greffés en urgence. La programmation de cellules souches pour migrer au site de la lésion est également envisageable.

## **10 Evaluation de la sécurité des cellules souches humaines**

### **Tissage d'un filet de sécurité pour les cellules souches**

Certains chercheurs pensent que dans 5 ans les cellules souches seront utilisées en clinique et d'autres estiment que beaucoup plus d'informations sur les cellules souches doivent être accumulées avant que leur potentiel thérapeutique soit évalué.

Avant d'utiliser les cellules souches embryonnaires un certain nombre de garde-fous doivent être mis en place.

### **L'assurance de la sécurité commence avec le criblage des donneurs adéquats**

Que les cellules proviennent d'adultes ou d'embryons, des précautions doivent être prises contre les maladies infectieuses et contre les défauts génétiques des donneurs, par exemple des mutations provoquant une maladie neuro-dégénérative comme le Parkinson. Les gènes directement responsables d'une maladie ou d'une anomalie physiologique sont relativement peu nombreux mais les produits de plusieurs gènes prédisposant à une maladie est beaucoup plus difficile et il ne sera pas possible de cribler les cellules souches pour la totalité des gènes associés à une maladie.

### **Utilisation de pratiques contrôlées, standardisées pour établir des cultures de cellules souches humaines en toute sécurité**

Des procédures standardisées, rigoureusement contrôlées devront être établies pour maintenir des cultures de cellules humaines. Les conditions de culture devront permettre de conserver les cellules sans altération de leurs propriétés intrinsèques, ce qui exigera la définition de concentrations des facteurs de croissance et des substances chimiques dans les milieux de culture. Le sérum de veau, en raison des dangers de l'encéphalite spongiforme bovine, devra être évité et les chercheurs sont engagés dans un vigoureux effort pour développer des milieux sans sérum.

### **Des alternatives à des cultures sur couche nutritive de cellules animales pour améliorer la sécurité.**

Les chercheurs doivent porter une attention particulière à des conditions de culture n'utilisant pas de cellules nourricières de souris. Geron Co a démontré que des cellules embryonnaires humaines peuvent être maintenues en culture, sans cellules de souris, grâce à des milieux conservant leur capacité proliférative et leur capacité de former les trois feuillets embryonnaires

### **La caractérisation détaillée des populations de cellules souches humaines renforce la sécurité**

Les cellules souches de l'adulte ont généralement des capacités de différenciation plus restreintes que les cellules embryonnaires. La caractérisation des cellules souches requière une série d'évaluations : 1) sur la morphologie cellulaire, 2) sur l'expression d'antigènes de surface particuliers, 3) sur la caractérisation de marqueurs biochimiques comme une activité enzymatique particulière, 4) sur l'expression de gènes propres à un type cellulaire. L'analyse des caryotypes peut être utile pour s'assurer de la stabilité génétique au cours du temps. Les développements des analyses d'ADN sur microarray renforcera la caractérisation cellulaire.

Avant que des essais cliniques puissent être réalisés il est essentiel de démontrer que les préparations de cellules ont l'activité biologique désirée. Par exemple libération d'insuline pour des cellules pancréatiques ou présence d'un marqueur prédisant l'activité comme la tyrosine hydroxylase pour des neurones dopaminergiques.

## **Preuve du concept, test de toxicité, et évaluation du potentiel prolifératif dans des modèles animaux sont importants pour assurer la sécurité des cellules souches humaines.**

Les cellules humaines doivent être transplantées dans des modèles animaux de la maladie humaine pour démontrer l'efficacité du greffon. Probablement que dans tous les cas une immunosuppression sera nécessaire en raison de l'incompatibilité génétique entre le modèle animal et l'homme. Le marquage avec un marqueur comme la GFP permet d'évaluer la migration des cellules injectées. Les techniques non-invasives comme l'IRM ou le PET permettent d'apprécier la durée et la solidité de la transplantation.

Les cellules souches embryonnaires humaines ont la caractéristique de causer des tératomes chez la souris. Les cellules souches indifférenciées ne sont pas considérées comme appropriées pour la transplantation en raison du risque d'une croissance non régulée. La question est de savoir à quel stade de différenciation ce risque devient négligeable. Avant tout essai clinique le potentiel de croissance non régulé en relation avec la différenciation doit être évalué.

## **11 Utilisation de cellules souches génétiquement modifiées dans les expériences de thérapie génique**

### **Principes et promesses de la thérapie génique**

Les chercheurs ont utilisé deux stratégies majeures pour délivrer des transgènes thérapeutiques dans le corps humain. Le premier étant d'introduire le gène directement dans le corps avec l'aide généralement d'un virus. La seconde implique l'usage de cellules du patient pour livrer le transgène dans le corps. Cette deuxième stratégie présente plusieurs avantages. D'abord le transgène est introduit dans les cellules à l'extérieur du corps ce qui permet de contrôler le transfert du gène dans les cellules. Le second avantage est de programmer le niveau et le taux de production du gène thérapeutique. Dans certains cas le transgène thérapeutique peut être activé seulement en réponse à certains signaux tels que des drogues administrées au patient.

### **Pourquoi les cellules souches sont utilisées dans des thérapies à base cellulaire ?**

Environ 40% des essais cliniques de thérapie génique effectués aux USA ont été à base cellulaire, parmi ceux-ci 30% ont utilisé des cellules souches. La raison majeure d'utiliser des cellules souches est que c'est une population qui s'auto-renouvelle. Les cellules souches hématopoïétiques ont été le matériel de choix parce qu'elles sont faciles à prélever, aisément manipulables in vitro et réinjectables dans la circulation. En plus du fait que ces cellules peuvent se différencier en tous les types de cellules sanguines elles peuvent aussi migrer dans différents organes : foie, rate, et ganglions lymphatiques.

En dehors des cellules HSC d'autres cellules souches ont été étudiées comme les myoblastes, les cellules souches nerveuses et les ostéoblastes.

Les myoblastes peuvent non seulement s'intégrer aux fibres musculaires mais aussi, comme le muscle est innervé et irrigué, ils peuvent servir à traiter des maladies non musculaires. Ils ont été utilisés pour traiter chez l'animal : des maladies lysosomales, l'hémophilie, certains types d'anémie. La sclérose latérale amyotrophique a été traitée chez l'animal par injection de myoblastes transportant le gène du NGF (nerve growth factor) dans les muscles du modèle murin et le transgène reste actif 12 semaines et ralentit les symptômes de la maladie.

Les cellules souches neurales produisant de la tyrosine désaminase ont été utilisées chez les rongeurs pour traiter le glioblastome. Les ostéoblastes sécrétant du bone growth factor ont été utilisés sur un modèle animal pour fournir de l'os.

### **Comment les cellules souches embryonnaires peuvent jouer un rôle dans la recherche en thérapie génique ?**

Le premier succès en thérapie génique a été obtenu par une équipe française (A. Fischer cité) pour une maladie d'immunodéficience liée au chromosome X. Les résultats décevants, obtenus par ailleurs, sont dus en général au nombre insuffisant de cellules venant de l'adulte ou du cordon ombilical. Les cellules souches embryonnaires permettraient de surmonter cette difficulté. Un caractère important de la cellule pour apporter un transgène thérapeutique est sa capacité à conserver le transgène même après

différenciation en cellules spécialisées. Pour introduire le transgène dans les cellules souches on peut stimuler leur division et utiliser des rétrovirus comme transgène.

Les thérapies géniques utilisant des HSC ont rencontré un problème connu comme « gène silencieux » le gène ne s'exprimant pas en raison de mécanismes cellulaires qui altèrent la zone chromosomique où le transgène a été inséré. On ne sait pas si l'utilisation de cellules souches embryonnaires peut surmonter ce problème.

La persistance de l'expression du transgène est un problème important qui peut être résolu de deux manières : par la longue vie de la cellule individuelle ou le maintien du transgène au cours des divisions. Les cellules embryonnaires semblent être moins limitées dans leur nombre de divisions que les cellules HSC. L'activité télomérasique est en relation avec la capacité proliférative et chez la souris les cellules embryonnaires ont montré une activité télomérasique plus élevée que les cellules souches de l'adulte. Les cellules souches embryonnaires peuvent être maintenues plus longtemps en culture, (ce qui paraît impossible avec les cellules du cordon) et être pluripotentes.

Les cellules souches embryonnaires permettent d'éviter les réactions immunitaires et des banques de cellules présentant les différents types de CMH pourraient être établies. Par contre les cellules souches peuvent former des tératomes et il est peut être préférable d'utiliser des cellules différenciées ou génétiquement modifiées pour donner un nombre limité de cellules types. De nouvelles recherches sont nécessaires pour savoir si les cellules souches différenciées gardent leurs avantages concernant la durée de vie. Même si les cellules différenciées n'avaient pas une durée de vie aussi longue que les cellules souches embryonnaires il serait possible de les modifier génétiquement pour les donner aux patients toutes les fois qu'il serait nécessaire.

De nouvelles connaissances sont nécessaires pour savoir quel est le vecteur viral ou non viral adéquat pour introduire le transgène dans la cellule, pour qu'elles secrètent l'agent thérapeutique de manière régulée, pour qu'elles génèrent une variété de types cellulaires. Les cellules souches pourraient aussi servir à évaluer les vecteurs et donner une idée sur la manière dont les gènes sont traduits chez les patients. La contribution majeure des cellules souches embryonnaires pour la thérapie génique pourrait être d'avancer la connaissance scientifique pour surmonter les obstacles techniques du transfert de gènes.

**Le rapport est complété par 7 appendices fournissant une masse importante de données expérimentales :**

- A Early Development
- B Mouse Embryonic Stem Cells
- C Human Embryonic Stem Cells and Embryonic Germ Cells
- D Stem Cell Tables (Comportant 4 rapports et 110 références)
- E Stem Cells Markers
- F Glossary and Terms
- G Informational Resources (83 personnes interviewées de différents pays, mais pas un seul français)

**Robert Manaranche**

*12 septembre 2001*