

CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES HUMAINES (CSEh)

CSEh →

- Cellules avec capacité de prolifération in vitro illimitée
- - Peuvent se différencier en tous les tissus de l'organisme => Cellules dites **pluripotentes**

Différents types de cellules souches humaines (maturité croissance) :

- **CS totipotentes** : Les plus immatures.

Dans l'embryon jusqu'au stade 4 à 8 cellules

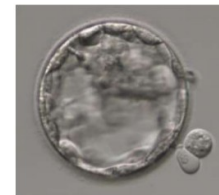
Elles peuvent conduire au développement complet d'un être humain.



- **CS pluripotentes** (=CSEh) :

Dans l'embryon de 5-6 jours = Préimplantatoire (au niveau de la MCI)

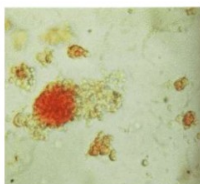
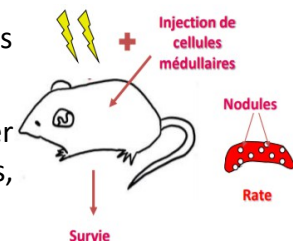
Peuvent conduire au développement des 3 feuillets de l'embryon.



- **CS multipotentes** (CS Adultes) :

Capables de donner naissance à un nombre limité de types cellulaires.

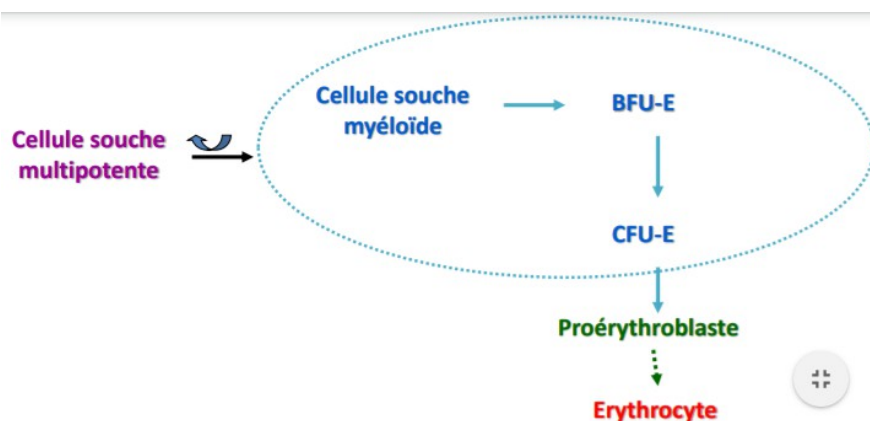
Ex : Les cellules souches hématopoïétiques peuvent donner naissance aux 3 lignées sanguines (leucocytes, hématies, thrombocyte).



- **CS déterminées ou progéniteurs** :

Capables de donner naissance à un seul type cellulaire identique à lui même.

Ex : CFU-E ne donne naissance qu'aux cellules de la lignée érythroblastique (déjà engagé dans la différenciation).



Le recueil des CS embryonnaires implique la destruction de l'embryon => Manipulations étroitement encadrées par les lois de bioéthique ET l'agence de biomédecine.

Problèmes éthiques liés aux CSEh

Agence de biomédecine

Dérivent d'un embryon humain:

- Implique la destruction de l'embryon
- Loi de bioéthique en France 2004 : possibilité de travailler sur des lignées de CSEh importées
- Autorisation de créer des lignées en France délivrée à quelques chercheurs en 2007
- Révision de la loi en 2011 puis en 2013:

*la **pertinence scientifique** du projet de recherche est établie ;
*la recherche s'inscrit dans une **finalité médicale** ;
*la recherche ne peut être menée sans recourir à ces embryons ou CSE
*le projet de recherche et les conditions de mise en œuvre du protocole respectent les **principes éthiques** relatifs à la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires.



Quel type d'embryon ?

- Embryons conçus in vitro dans le cadre de l'AMP (Assistance Médicale à la procréation) mais qui ne font plus l'objet d'un projet parental (congelés, embryons surnuméraires).
- Consentement écrit du couple clairement informé (délai de 3 mois)

Protocoles de recherche : Autorisés par l'**Agence de Biomédecine**

NB : les embryons sur lesquels une recherche a été conduite ne peuvent être transférés à des fins de gestation !

Culture des CSEh

Il faut utiliser un support sur lequel cultiver les CSEh :

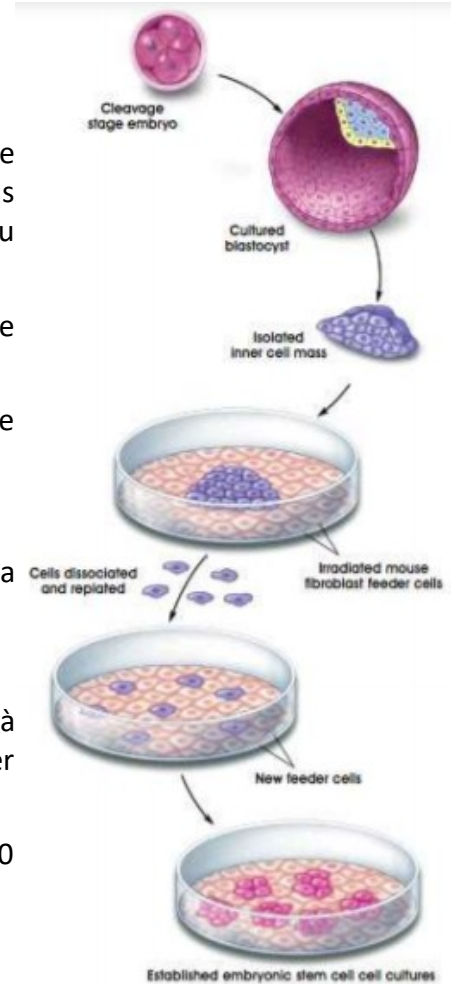
- Un support :
 - Fibroblastes murins (=souris) ou humains (capacité d'inhibition de contact)
 - Matrice de synthèse (relativement cher) : protéines recombinantes purifiées
 - Protéines de la basale : coût++

- Un milieu de culture adapté :
 - Sérum de Veau fœtal (SVF) : contient des facteurs de croissance ++, permet de faire pousser les cellules, mais abandonné car trop variable (la qualité du sérum dépend du veau qui a subi le prélèvement, donc variabilité du sérum)
 - KO-SR (Knock Out Serum Replacement) + facteurs de croissance : FGF2 et IGF2

=> Nécessité de standardiser les conditions de culture Culture prolongée des CSEh

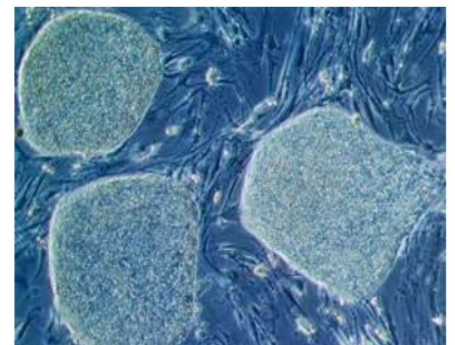
- Éviter la différenciation précoce spontanée pour conserver la pluripotence
 - Changement quotidien du milieu de culture
 - Dissociation des colonies avant qu'elles n'arrivent à confluence : les colonies doivent rester isolées, ne pas entrer en contact sinon elles se différencient
 - => Possibilité de les cultiver 2 à 3 ans (150 passages = 150 transferts de milieu)
- Risques de la culture prolongée augmente avec le temps :
 - Modification du phénotype et de la capacité de différenciation
 - Anomalies du caryotype (trisomies 12 ou 17) favorisé par la trypsine => CS inutilisables en thérapeutique

En général, on évite donc une culture prolongée des CSEh (1 an max).



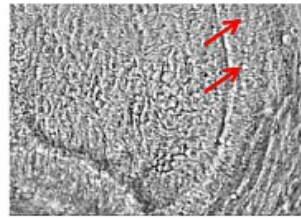
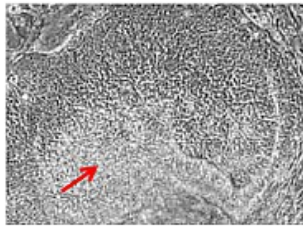
- Les CSEh sont des cellules de petites tailles présentes dans des colonies.
- Ces colonies ont des bordures nettes au stade indifférencié.

Colonies de cellules indifférenciées: bordures nettes

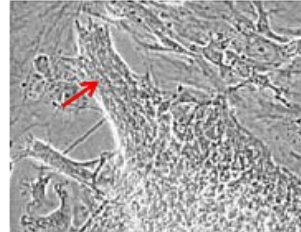
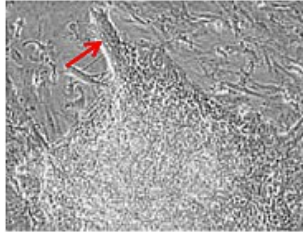


Différenciation des CSEh

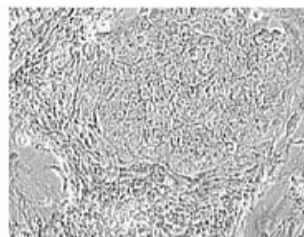
- Le but final des CSEh est de pouvoir contrôler leur différenciation pour obtenir toutes les cellules que l'on veut (cellules nerveuse, musculaire, sanguine, épithéliale,...).
- Quand les colonies se différencient, il existe des modifications morphologiques en culture des colonies : la bordure n'est pas nette avec des prolongements dendritiques



Aplatissement et migration des cellules du centre de la colonie. Les cellules du bord s'empilent.



Des prolongements "dendritiques" s'étendent à partir des bords de la colonie.



Les colonies de CSEh n'ont plus de bordure nette. Les cellules des bords augmentent de taille et s'échappent de la colonie.

Caractérisation des CSEh

Avant d'utiliser les CSEh, il faut s'assurer que les cellules obtenues sont bien pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles sont bien des cellules souches embryonnaires humaines. Pour cela, on va vérifier qu'elles peuvent bien donner naissance aux trois feuillets embryonnaires en les caractérisant à la fois in vitro et in vivo.

In vitro

• Cultivées en l'absence de facteurs (FGF et IGF) nécessaires au maintien de leur état indifférencié + conditions non adhérentes : les CSEh donnent naissance à des corps embryoides.

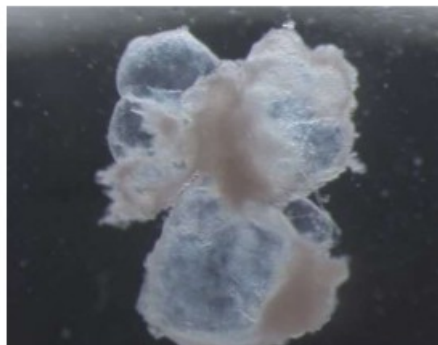
=> Ces corps embryoides sont observés uniquement en culture.

Les corps embryoides contiennent normalement les 3 feuillets embryonnaires (entoblaste, mésoblaste, ectoblaste).

On va donc vérifier qu'on a bien obtenu les 3 feuillets de l'embryon dans le corps embryoides.

Corps embryoides:

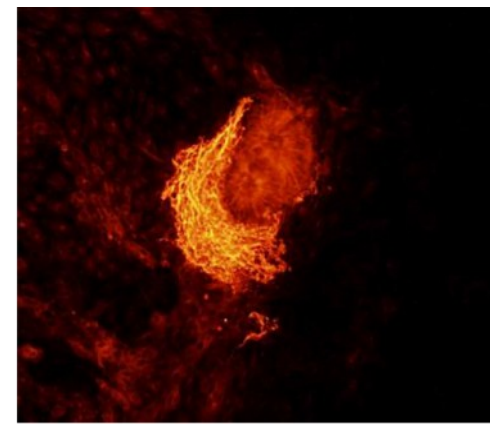
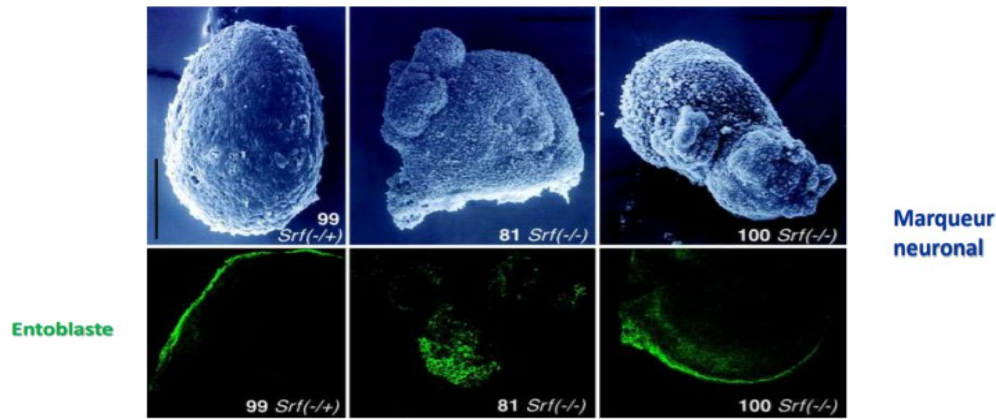
- Colonies sphériques de CSEh,
- Observées uniquement en culture,
- Contiennent les 3 feuillets: entoblaste, mésoblaste et ectoblaste.



Formation de corps embryoides :

- support plastique
- sans FGF
- avec SVF

Pour cela, on utilise des marqueurs avec immunofluorescence (anticorps monoclonaux) spécifiques des 3 feuillets de l'embryon qui montreront bien la formation des 3 feuillets :

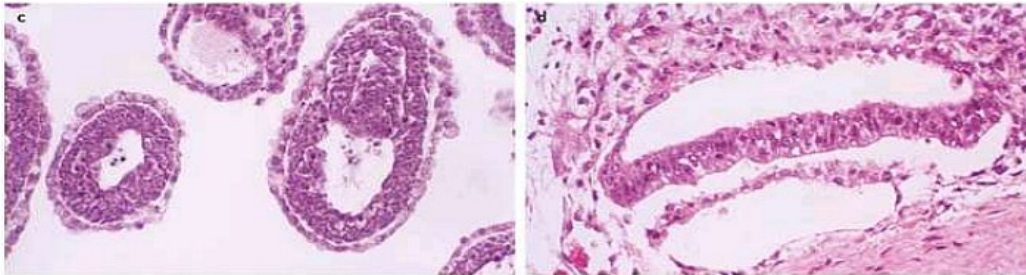


In vivo :

- On va injecter les CSEh à une souris immunodéficiente (pour ne pas qu'elle les rejette). Normalement, on doit observer la formation sur la souris de tumeurs : TERATOME (bénin), ou TERATOCARCINOME (malin) qui contiennent un mélange des tissus issus des 3 feuillets embryonnaires (os, cartilage, peau, intestin,...)

Pourquoi cultiver des CSEh ?

- Étude des mécanismes moléculaires mis en jeu lors du développement humain normal : impossible in utero
 - Les facteurs moléculaires qui interviennent dans embryogenèse, se retrouvent aussi dans l'**oncogénèse** et au niveau des **tumeurs embryonnaires**. Ainsi, comprendre les CSEh permet de mieux comprendre ces deux domaines aussi.



c | Corps embryôides après injection intra-péritonéale de cellules de **carcinome embryonnaire murin**. Les structures contiennent 2 couches cellulaires et ressemblent aux embryons de souris post-implantatoires

d | Corps embryôide humain dans un **tératocarcinome testiculaire**; il ressemble à un embryon humain précoce

- Thérapie cellulaire
 - Nombre illimité de cellules différenciées spécialisées
 - peu d'immunogénécité in vivo (donc traitement immunorépresseur léger)
 - se différencient in vitro en cellules hépatiques, pancréatiques, cardiaques, neuronales...
 - Diabète de type I
 - Infarctus du myocarde
 - Parkinson (neurones dopaminergiques)

MAIS énorme risque : si au milieu des cellules différenciées injectées persiste une seule cellule souche indifférenciée, celle ci va induire une tumeur chez l'homme : TERATOME,..

Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell–derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration

•[Lyndon da Cruz](#), Kate Fynes, [Peter J Coffey](#)

Nature Biotechnology **volume 36**, pages 328–337 (2018)

Gain visuel persistant après 12 mois chez deux patients traités

Stem cell-derived cardiomyocytes heal a broken heart

•[Grant Otto](#)

Nature Reviews Drug Discovery **volume 17**, page 622 (2018)

À ce jour toutefois, si les essais cliniques se multiplient, « ces approches thérapeutiques ne sont pas encore validées », rappelle [l'Inserm sur son site](#). « Une seule cellule restée indifférenciée se renouvellerait indéfiniment dans l'organisme du patient la recevant, risquant de provoquer un cancer ». D'où l'importance d'encadrer et suivre précautionneusement les traitements expérimentaux.

Alternatives aux CSEh ?

- CS adultes

- multipotentes (ou déterminées?)
- pas de problème éthique
- pas d'immunogénicité *in vivo* (si prélevées chez le même individu)
- bien connues pour le système hématopoïétique, la peau, la glande mammaire

Limites:

- nombre de cellules
- vieillissement avec l'individu

- iPS : induced pluripotent stem cells

- issues de tissus différenciés
- reprogrammation forcée vers un statut embryonnaire par (transfection de gènes ou culture avec protéines recombinantes : Oct4, Sox2, KLF4, c-myc)
- pas de problème éthique
- pas d'immunogénicité *in vivo*
- Culture comparable à celle des cellules CSEh

Limites:

- gènes de dédifférenciation: risque carcinogène ++++

- **iPS : induced pluripotent stem cells**
 - Essais thérapeutiques
 - Régénération rétinienne lors de DMLA: Mandai M et al, NEJM 2017
- DMLA: néovascularisation épithélium pigmentaire de la rétine en regard de la macula
 - Réséquer l'épithélium pigmentaire et le remplacer
 - Par celui de proximité : compliqué
 - Par de l'EP dérivé de CSEh: complications liées à l'immunosuppression
 - Par des iPS issues du patient et différenciées en cellules de l'EP.
Réalisé chez 1/2 patients
- **Buts:**
 - Vérifier l'absence d'effet 2^{aire}
 - Evaluer le bénéfice de la greffe
- **Contrôle des cellules :**
 - NGS pour expression génique et méthylation de l'ADN comparés au tissu normal
 - Injection à la souris NOG (immunodéficiente): vérifier absence de tumeur
 - Vérification que le plasmide utilisé n'est pas intégré au génome
- **Résultats à 1 an:**
 - Pas d'amélioration de l'AV
 - Mais vision plus claire (membrane enlevée)
 - Pas de tumeur
- Patient 2 non traité car amélioré sous traitement anti VEGF et anomalies chromosomiques dans les cellules iPS