

Bilan de 15 ans de recherches sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires autorisées par l'Agence de la biomédecine

mars 2020

1. Le nombre de protocoles de recherche et son évolution

2. Diversité des protocoles

Les recherches utilisant des cellules souches embryonnaires humaines (CSEh)

Dérivation de lignées de cellules souches embryonnaires humaines (CSEh)

Thérapie cellulaire directe à court et moyen terme

Recherche translationnelle

Thérapie cellulaire à long terme

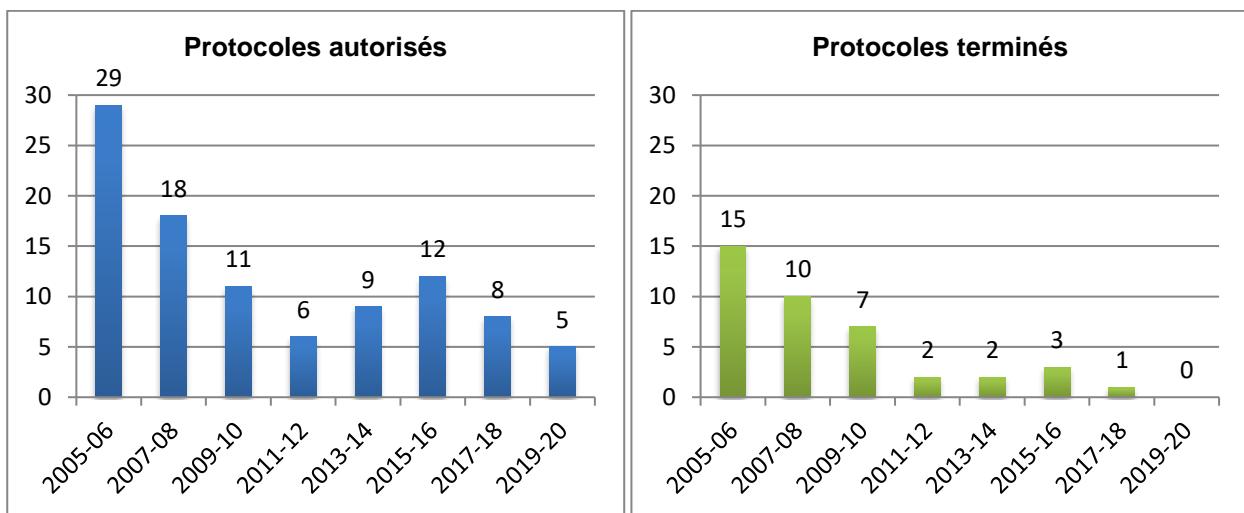
Comprendre la différenciation

Modéliser les maladies

Comprendre la pluripotence

Les recherches sur l'embryon

1. Le nombre de protocoles de recherche et son évolution



Nombre de protocoles de recherche par année d'autorisation.

Les premières autorisations de recherches sur les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) et les embryons humains ont été délivrées en 2005. Au total, 98 protocoles ont été lancés et 58 sont encore en cours¹.

Après une première vague d'autorisations délivrées en 2005-2006 suite à la mise en place de ces nouvelles recherches en France, le nombre de nouveaux protocoles autorisés chaque année a diminué entre 2007 et 2012,, puis augmenté légèrement de 2013 à 2016, avant de se stabiliser (graphique de gauche).

La diminution du nombre de demandes d'autorisation entre 2007 et 2012 a sans doute une origine multiple :

- le nombre d'équipes françaises œuvrant dans ce champ de recherche est limité ;
- ces recherches mobilisent des moyens financiers et humains importants, lourds et longs à mettre en œuvre avant que la recherche elle-même puisse vraiment démarrer ; de tels moyens anticipent des projets pérennes, inscrits dans la durée ;
- la possibilité, depuis 2007, de travailler avec des cellules souches pluripotentes reprogrammées (*induced Pluripotent Stem cells* – iPS) ; ne posant pas les mêmes questions éthiques que les cellules souches embryonnaires – leur dérivation ne passe pas par la destruction d'un embryon –, elles ne requièrent pas d'autorisation spécifique ; elles offrent une alternative pour certaines recherches.

L'augmentation constatée depuis 2013 peut s'expliquer de deux manières :

- un regain d'intérêt pour la recherche sur l'embryon : 10 autorisations délivrées depuis 2015 alors qu'il n'y en avait eu que deux entre 2009 et 2013 ;
- l'utilisation des CSEh comme contrôle de la pluripotence des iPS ; cela illustre la complémentarité des deux types cellulaires. Dans le même esprit, certaines équipes sollicitent une autorisation de recherche sur les CSEh après avoir échoué dans la mise au point d'un protocole de différenciation avec les iPS.

Sur les 98 protocoles autorisés, 40 sont aujourd'hui terminés ou ont été arrêtés. Dans la majeure partie des cas, la recherche était arrivée à son terme :

- les projets de dérivation de lignées de CSEh à partir d'embryons : une fois les lignées obtenues, les recherches ont évolué vers d'autres protocoles, utilisant ou non ces lignées ;
- les protocoles sur des questions très ponctuelles, comme par exemple l'analyse de l'expression d'une protéine chez l'embryon.

Le temps long de la recherche : les résultats ne peuvent être acquis qu'après plusieurs années.

Alors que le domaine était inexistant avant 2005 en France, le dynamisme et le professionnalisme des équipes de recherche ont permis une évolution rapide et une reconnaissance de la recherche française au niveau international. Le nombre et la qualité des publications issues des laboratoires de recherche en France en témoignent.

Il s'agit cependant d'une recherche longue, parsemée d'aléas. Ainsi, un quart des projets en cours (14) ont été engagés dès 2005-2006. Il s'écoule un minimum de 5 ans environ entre le début de la recherche et la soumission des premiers résultats, surtout s'ils sont publiés dans des revues internationales prestigieuses. De même, ce n'est qu'après au moins 10 ans de travail que l'on peut espérer voir l'inclusion des premiers patients dans un essai clinique.

Les équipes de recherche

Les équipes menant ces recherches, une quarantaine, sont hétérogènes. La plupart font partie d'un centre de recherche de masse critique importante. Le principal est I-Stem, à Evry, entièrement dédié aux recherches sur les CSEh et les iPS : mis en place par Marc Peschanski et actuellement dirigé par Cécile Martinat, ce laboratoire est titulaire d'un quart des autorisations délivrées par l'Agence de la biomédecine. L'infrastructure nationale de biologie

¹ Il s'agit des autorisations de protocoles de recherche. Les autorisations d'importation ou de conservation de lignées de cellules souches embryonnaires ne sont donc pas incluses.

INGESTEM, dirigée par Anne-Lise Bennaceur, et l'Institut de recherches en biothérapies (IRB) de Montpellier, dirigé par Christian Jorgensen, consacrent une grande part de leurs travaux aux cellules souches pluripotentes. Les équipes de Laurent David (CHU Nantes) et de Pierre Savatier (INSERM – Hospices civils de Lyon) mènent quant à elles des recherches à la fois sur l'embryon et sur les cellules souches embryonnaires. Les autres équipes sont de plus petite taille et dispersées sur le territoire.

2. Diversité des protocoles

Sur les 58 protocoles en cours en mars 2020 :

- 49 utilisent des cellules souches embryonnaires ;
- 9 ont pour objet l'embryon.

Les recherches utilisant des cellules souches embryonnaires humaines (CSEh)

Les lignées de cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) utilisées sont dans leur grande majorité importées, essentiellement les lignées dites H1 et H9 (1998), SA01, ou encore RC9. Cette relative homogénéité des CSEh utilisées contraste avec l'extrême hétérogénéité des iPS, dont la dérivation ne nécessite pas d'autorisation spécifique.

Les 49 protocoles utilisant des CSEh ont pour objectif l'obtention de cellules de différents tissus de l'organisme (cellules différenciées) avec une certaine prédominance du tissu nerveux et du foie. Tous ont une finalité médicale plus ou moins proche, qui s'exprime de façon variée. Ainsi, quelques protocoles abordent un aspect plus fondamental, visant généralement à comprendre l'état « pluripotent » des cellules souches embryonnaires et sa régulation.

Ces recherches ont conduit à des essais cliniques : quatre essais de thérapie cellulaire de phase I² (un achevé, un en cours et deux prochainement lancés) et deux essais de phase II² sur des molécules identifiées par criblage à l'issue de l'identification de la mutation à l'origine d'une maladie.

L'évolution des protocoles autorisés suit celle des recherches dans ce domaine :

- Les protocoles initiaux étaient voués à la différenciation de cellules souches embryonnaires humaines en différents tissus, souvent à la suite de recherches semblables déjà menées avec les cellules souches embryonnaires de souris (modèle murin). Ils ont utilisé des lignées de cellules importées. Certains de ces protocoles au long cours se poursuivent aujourd'hui.
- Les premiers protocoles visant à modéliser une maladie humaine sont également apparus dès 2005. Ils étudient l'influence d'une mutation à l'origine d'un trouble ou d'une pathologie sur la différenciation des CSEh en divers types cellulaires. Une fois les effets de la mutation identifiés, un criblage pharmacologique de molécules sur CSEh peut être réalisé afin d'identifier des traitements permettant d'atténuer ces effets.
- Dans les années 2008-2011, quatre équipes ont entrepris de dériver de nouvelles lignées de cellules souches embryonnaires. Ces projets ont tous abouti.
- À partir de 2010 ont émergé des protocoles de recherches dites translationnelles. Ils émanaient de sociétés de service en biotechnologie travaillant en lien étroit avec des équipes académiques, généralement dans un but de préparation d'essais cliniques.

² Le développement d'un nouveau traitement se déroule le plus souvent en quatre phases, précédées d'une phase dite préclinique. Chaque phase peut comporter plusieurs essais cliniques, qui ont pour but d'évaluer l'efficacité et la tolérance du traitement. La phase I vise à cerner la toxicité du traitement étudié. La phase II vise à démontrer l'efficacité du traitement et déterminer la dose optimale et les éventuels effets indésirables.

- Depuis 2010 également, dans beaucoup de protocoles, les recherches ne ciblent plus directement les CSEh, mais les cellules souches pluripotentes reprogrammées (iPS). Les CSEh y servent avant tout de référence pour contrôler la pluripotence et la différenciation des iPS.

Dérivation de lignées de cellules souches embryonnaires humaines (CSEh)

Les équipes qui ont entrepris de dériver de nouvelles lignées de CSEh à partir d'embryons préimplantatoires donnés à la recherche travaillaient en étroite collaboration avec un centre AMP, en général sur le même site.

Elles ont obtenu [28 lignées](#)³ répondant aux critères de pluripotence requis, 25 porteuses d'une mutation associée à une maladie génétique (ayant justifié la procédure de diagnostic préimplantatoire) et 3 normales. Pour dériver ces lignées, environ 850 embryons ont été utilisés.

Aujourd'hui, 11 de ces lignées sont utilisées dans des protocoles autorisés en France. La lignée OSCAR, dérivée par l'équipe de Pierre Savatier (INSERM, Hospices civils de Lyon), outre qu'elle est utilisée dans plusieurs protocoles en France, a été exportée aux États-Unis.

Thérapie cellulaire directe à court et moyen terme

Les protocoles ayant un objectif thérapeutique à court et moyen terme visent à fournir des produits de thérapie cellulaire destinés à réparer un organe malade. Les produits greffés sont soit des cellules différenciées, soit des progéniteurs (cellules filles des cellules souches embryonnaires, ayant atteint un stade de différenciation antérieur au stade final).

Le bilan est très positif. Quatre protocoles ont conduit au développement de produits de thérapie cellulaire : deux ont abouti à un essai clinique de phase I², deux autres en sont très proches.

- Un **essai clinique terminé** (2014-2017) sur le traitement de l'insuffisance cardiaque (Pr Philippe Menasché) par la greffe de cellules progénitrices des cellules cardiaques. Les résultats ont été publiés dans la revue de référence *Journal of American College of Cardiology*. Sur les six patients inclus dans cet essai, deux sont décédés sans qu'aucun lien n'ait été mis en évidence avec la greffe (le premier des suites de comorbidités importantes quelques jours après l'implantation des cellules, le second 22 mois après, des suites d'un arrêt cardiaque). Une amélioration de l'activité cardiaque a été constatée dans la zone traitée chez les patients. Aucun évènement indésirable lié aux cellules greffées n'a été mis en évidence.
- Un **essai clinique en cours de recrutement** sur le traitement de la rétinite pigmentaire (Christelle Monville/Marc Peschanski, I-Stem). Il a été autorisé début 2019. Cette équipe a mis au point un protocole de différenciation des cellules souches embryonnaires en cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine⁴ qui peuvent être greffées chez les patients souffrant de cette pathologie oculaire congénitale⁵. Ces travaux ont par ailleurs donné lieu à trois publications dans des revues scientifiques.
- **Deux projets feront très prochainement l'objet d'une demande d'essai clinique**. Le premier a pour objet le traitement des ulcères de la peau liés à la drépanocytose (Gilles Lemaître/Marc Peschanski, I-Stem). Cette équipe a dérivé un substitut cutané à partir de CSEh qui pourra être appliqué sous forme de pansement. Le deuxième concerne le traitement des maladies métaboliques du foie (Tuan Huy Nguyen, société GoLiver Therapeutics, Nantes). Cette équipe a mis au point un protocole de différenciation des cellules souches embryonnaires en hépatocytes qui pourront être greffées chez le patient atteint d'insuffisance hépatique aiguë.

³ La liste peut être consultée sur : <https://www.agence-biomedecine.fr/liste-et-caracteristiques>

⁴ L'épithélium pigmentaire est la couche de cellules la plus externe de la rétine.

⁵ Une pathologie congénitale est une maladie qui apparaît à la naissance.

Recherche translationnelle

Les essais cliniques s'accompagnent de recherches dites translationnelles. Leur objectif est de réaliser les étapes permettant d'adapter un protocole mis au point à l'échelle du laboratoire de recherche purement biologique à une utilisation en clinique chez le patient : production de lots cliniques à grande échelle et dans conditions de sécurité définies, évaluation de la sécurité biologique du produit de thérapie cellulaire... On peut citer les travaux du Pr Jérôme Larghero (Unité de thérapie cellulaire de l'hôpital Saint-Louis, Paris), qui a réalisé toutes les étapes de recherche translationnelle associées à l'essai clinique mené par le Pr Philippe Menasché dans le traitement de l'insuffisance cardiaque.

Thérapie cellulaire à long terme

Plusieurs protocoles ont un objectif thérapeutique à plus long terme, pas nécessairement sous la forme d'un essai clinique. Par exemple, une équipe cherche à trouver un produit substitutif transfusionnel sous la forme de globules rouges issus de la différenciation de cellules souches pluripotentes (Luc Douay, Établissement français du sang). Cette équipe a mis au point un protocole permettant de reproduire *in vitro* le processus de différenciation de cellules souches embryonnaires en globules rouges (érythropoïèse). Elle a également étudié les mécanismes permettant de passer d'une érythropoïèse incomplète à une érythropoïèse complète.

Des équipes travaillent à l'obtention d'hépatocytes (cellules du foie), pour passer le cap d'une toxicité aiguë du foie (hépatite virale ou médicamenteuse), ou de cellules bêta pancréatiques qui synthétisent l'insuline, hormone qui fait défaut chez les diabétiques. Par exemple, la Pr Julie Kerr-Conte (CHU de Lille) utilise les CSEh en vue d'adapter à la différenciation des lignées d'iPS en cellules bêta du pancréas un protocole décrit dans la littérature sur la lignée de CSEh H9.

Comprendre la différenciation

D'autres projets n'ont pas de finalité thérapeutique proche, mais travaillent à comprendre les étapes menant d'une cellule souche pluripotente aux cellules différenciées d'un tissu donné. Comprendre ces mécanismes pourrait permettre de les réactiver chez les patients.

Deux protocoles engagés dès 2005 se poursuivent aujourd'hui. Le protocole coordonné par Michel Pucéat (INSERM, Faculté de médecine La Timone à Marseille), a pour objectif d'étudier les mécanismes génétiques de la spécification cardiaque des cellules souches embryonnaires. Le protocole de Sylvain Lehmann (CNRS, Montpellier) a pour objectif de mettre au point des outils thérapeutiques pour soigner les maladies neurodégénératives.

Outre les travaux sur les hépatocytes ou les différents types de neurones, on peut citer les travaux de deux équipes sur les cellules du sang. L'équipe d'Anne-Lise Bennaceur (Université Paris Sud) travaille à obtenir, à partir de CSEh, des cellules souches hématopoïétiques proches de celles que l'on utilise dans les greffes de moelle osseuse ou de sang de cordon. L'équipe de William Vainchenker cherche à différencier les CSEh en progéniteurs de cellules sanguines granuleuses ou lymphoïdes.

D'autres protocoles visent à essayer de produire des cellules épithéliales respiratoires (travaux de l'équipe de Christelle Coraux, CHU de Reims) ou encore des cellules musculaires squelettiques – objectif encore impossible à atteindre aujourd'hui – pour le traitement des myopathies (travaux de l'équipe de Christian Pinset, I-Stem).

Enfin, les travaux du Pr Georges Uzan (hôpital Paul Brousse) pour but de produire, à partir de CSEh, des progéniteurs endothéliaux (cellules bordant les vaisseaux), dont on connaît l'importance dans les pathologies liées à un défaut de vascularisation, ainsi que dans la vascularisation pour la fonctionnalité de greffons.

Modéliser les maladies

Certains protocoles ont pour objectif de modéliser une pathologie et d'en comprendre les mécanismes. Dans ce cas, les chercheurs utilisent des CSEh dérivées d'embryons porteurs des mutations causales de la pathologie. L'idée est

d'induire la différenciation de ces CSEh et d'identifier les voies altérées. Cette étape de compréhension et d'identification d'un défaut moléculaire est suivie d'une étape de recherche de composés susceptibles de corriger ce défaut, généralement par criblage de bibliothèques de composés chimiques (académiques ou commerciales) sur les CSEh. Il y a donc une double finalité : cognitive et thérapeutique.

Un programme modélise les anomalies neuronales de la maladie de Huntington à partir de CSEh porteuses de la mutation (Anselme Perrier, I-Stem). Il a décrit un mécanisme impliquant un gène répresseur, aboutissant à une inhibition de la neurogenèse. Celle-ci a pu être levée par un composé identifié par criblage. L'action bénéfique *in vivo* de ce composé sur la maladie de Huntington a été montrée chez la souris.

Un autre protocole analyse les anomalies de fabrication du pigment mélanine dans les cellules de peau dérivées de CSEh issues d'embryons porteurs de mutations caractéristiques de la neurofibromatose (Christine Baldeschi, I-Stem). Cette maladie génétique conduit notamment à des tumeurs bénignes des gaines des nerfs périphériques et à l'apparition de taches cutanées hyperpigmentées. Les manifestations sont différentes d'une personne atteinte à l'autre et peuvent conduire à des gliomes des voies optiques ou des tumeurs cérébrales graves. Cette équipe a mis en évidence certains des mécanismes moléculaires conduisant à certaines de ces anomalies.

Une autre stratégie de modélisation consiste à mimer les conséquences d'une mutation génétique dans des lignées de CSEh normales – par exemple en empêchant la traduction de l'ARN et de la protéine en cause. C'est ce que fait une équipe (Alexandra Benchoua/Marc Peschanski, I-Stem) pour analyser les conséquences des mutations du gène Shank3 impliqué dans le spectre autistique sur les progéniteurs du cortex issus de CSEh normales. Elle teste ensuite la possibilité de restaurer le fonctionnement normal à l'aide de molécules.

Dans ces protocoles, la finalité médicale est représentée avant tout par l'association de la recherche à **un criblage de composés pour trouver une molécule thérapeutique**. Cette démarche est développée en grande partie par les équipes d'I-Stem à Évry (Marc Peschanski). Deux projets menés par ce laboratoire ont ainsi permis l'identification par criblage sur CSEh de deux molécules utilisées récemment dans des essais cliniques de phase II² : la metformine, sur des patients atteints de la myotonie de Steinert, maladie génétique orpheline, et le lithium, sur des patients atteints du syndrome de Phelan-McDermid, une forme d'autisme génétique rare.

Comprendre la pluripotence

Dans ces recherches, l'objectif cognitif prédomine, mais elles ont des conséquences dans le domaine médical. On peut distinguer les recherches pour comprendre :

- les caractéristiques de l'« état pluripotent » : existe-t-il un ou des états de pluripotence, à des degrés différents, et qui seraient interchangeables ? Quelles combinaisons de protéines sont nécessaires à ces états ? Lesquels de ces états sont les plus favorables à une utilisation thérapeutique ? On peut citer deux équipes travaillant sur ces sujets, celle de Pierre Savatier (INSERM, Hospices civils de Lyon) et celle de Laurent David (CHU de Nantes) ;
- les points clés de la formation de tissus *via* le processus d'embryogenèse que peut représenter la différenciation de CSEh : par exemple la formation du cœur, ou le processus d'inactivation du chromosome X (travaux de l'équipe de Claire Rougeule, CNRS, université Denis Diderot), dont des anomalies peuvent être à l'origine de pathologies graves.

Les recherches sur l'embryon

Les recherches dont l'embryon est l'objet d'étude ont conduit à **19 publications**. Neuf protocoles sont en cours.

Peu d'équipes se sont lancées dans ces recherches avant 2014 (7 projets autorisés). Depuis 2015, elles ont suscité un regain d'intérêt (10 projets autorisés). Des équipes ont entamé des programmes ambitieux utilisant des approches novatrices comme les approches « omiques » (appréhension des systèmes biologiques complexes et dynamiques dans leur globalité : génomique, transcriptomique, protéomique...), l'analyse épigénétique (étude de l'expression, ou non,

des gènes par les cellules) ou l'étude mécanique de la morphogénèse (changements de forme) de l'embryon préimplantatoire⁶. Il est encore trop tôt pour en évaluer l'impact en termes de publications

Bien que les équipes étudiant l'embryon soient peu nombreuses, elles sont reconnues dans le domaine de la procréation ou du développement embryonnaire, y compris dans le contexte d'une maladie génétique. On note ainsi des publications dans des **revues internationales prestigieuses** (*Nature*, *Nature Communication* ou encore la revue internationale de référence dans le domaine de la procréation et de l'embryologie, *Human Reproduction*).

Elles ont permis des avancées majeures :

- identification de **marqueurs de la qualité embryonnaire** et/ou **prédictif d'une meilleure implantation** qui pourraient permettre d'améliorer les taux de réussite des FIV (deux projets) ;
- identification d'un peptide qui, mis en culture avec l'embryon, permet d'**améliorer son développement préimplantatoire** (ce peptide sera prochainement impliqué dans un essai clinique) ;
- étude des mécanismes conduisant, chez l'homme, à l'**inactivation du chromosome X** dont l'altération conduit à des maladies génétiques graves (une publication dans *Nature*) ;
- étude de l'impact de **mutations mitochondriales** sur le développement embryonnaire,
- étude de la **mise en place de la pluripotence** au cours du développement embryonnaire précoce (une publication dans *Nature Communication*).

⁶ Entre la fécondation et le stade de développement où l'embryon s'implante dans la paroi de l'utérus. Ce stade de développement embryonnaire précoce appelé blastocyste (100 à 200 cellules par divisions successives) et atteint environ 5 jours après la fécondation.