

Les cellules souches pluripotentes induites : un nouveau paradigme pour l'étude des tissus humains

Caroline Sansac^{1,2,3}, Said Assou^{1,2,4}, Julien Bouckenheimer^{1,2,3}, Jean-Marc Lemaître^{1,2,5}
et John De Vos^{1,2,4,5,6,7}

¹ CHU Montpellier, Institut de Recherche de Médecine Régénératrice et de Biothérapies, Hôpital Saint-Éloi, 80 avenue Augustin Fliche, 34295 Montpellier Cedex 5, France

² INSERM, U1183, 34000 Montpellier, France

³ Université de Montpellier, UFR de Pharmacie, 34000 Montpellier, France

⁴ Université de Montpellier, UFR de Médecine, 34000 Montpellier, France

⁵ CHU Montpellier, Plateforme iPSCs SAFE-IPS, Institut de Recherche de Médecine Régénératrice et de Biothérapies, 34000 Montpellier, France

⁶ Institut de Biologie Computationnelle, 34000 Montpellier, France

⁷ CHU Montpellier, Département d'Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Hôpital Saint-Éloi, 34000 Montpellier, France
Auteur correspondant : John De Vos, john.devos@inserm.fr

Reçu le 3 avril 2016

Résumé – La reprogrammation cellulaire permet d'obtenir des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) par l'expression forcée, et limitée dans le temps, de quatre facteurs de transcription embryonnaires. La découverte de cette technologie permettant de convertir une cellule différenciée en une cellule pluripotente a conduit à un profond changement de paradigme dans la notion d'identité cellulaire, puisqu'il est dorénavant possible de produire *in vitro* n'importe quel type cellulaire à partir d'un prélèvement d'un donneur sain ou d'un patient. Le champ d'applications des iPSC est très large, et comporte notamment la modélisation *in vitro* de tissus normaux ou pathologiques, y compris pour le criblage à haut débit de petites molécules pour le développement de nouveaux médicaments. La technologie des iPSC ouvre également de nouvelles voies thérapeutiques dans le domaine de la médecine régénératrice.

Mots clés : Cellules souches / cellules souches pluripotentes induites / pluripotence / médecine régénératrice / modélisation de tissus

Abstract – Induced pluripotent stem cells: a new paradigm to study human tissues.

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are obtained by reprogramming differentiated cells through forced expression of four embryonic transcription factors. The discovery of this technology, able to transform a differentiated cell into a pluripotent cell, has profoundly shifted the paradigm of the concept of cell identity, since it is now possible to obtain *in vitro* any cell type from an initial sample of skin or blood cells from a healthy volunteer or patient. Applications of iPSCs are exceedingly large, and comprise the *in vitro* modeling of normal or pathological tissues, including for massive drug screening. They also open new therapeutic avenues in the field of regenerative medicine.

Key words: Stem cells / induced pluripotent stem cells / cell reprogramming / pluripotency / regenerative medicine

Abréviations

BMP *Bone Morphogenetic Protein*
CSE cellules souches embryonnaires

CSP cellules souches pluripotentes
EB *embryoid bodies*,
FdT facteurs de transcription
iPSC cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes (CSP) sont des cellules souches capables de se différencier en tout type cellulaire de l'organisme. La découverte des cellules souches pluripotentes découle de l'étude dans les années 70 des tératomes, ces tumeurs bénignes comportant de nombreux tissus matures, y compris, de manière spectaculaire, des phanères tels que des dents et des cheveux. Des CSP ont pu être identifiées et isolées à partir de l'embryon au début de son développement – le stade blastocyste – d'abord dans la souris puis chez l'homme (Evans & Kaufman, 1981; Thomson *et al.*, 1998). Les CSP isolées à partir de l'embryon prolifèrent *in vitro* et constituent des lignées de cellules souches embryonnaires (CSE). Les applications des CSE sont nombreuses, permettant de produire une très large diversité de tissus, ouvrant ainsi la porte à l'étude de leur développement *in vitro*, de leur physiologie ainsi qu'à la production en quantité théoriquement illimitée de cellules et tissus pour une médecine régénératrice (Ramirez *et al.*, 2010). Il convient de souligner que l'utilisation des CSE de souris a permis la création des souris *knock-out* (KO) et transgéniques qui ont apporté une contribution majeure à la biologie contemporaine (Vogel, 2007). Cependant, les CSE posent notamment le problème de la difficulté de choisir le génotype de la lignée ES. Cette difficulté peut être résolue par le clonage thérapeutique, qui a été proposé comme stratégie d'avenir pour la médecine régénératrice (Wakayama, 2004). Cependant, cette technique est très difficile à mettre en œuvre sur le plan technologique, et n'a finalement été appliquée à des cellules humaines qu'en 2013, après près de 10 ans de tentatives infructueuses (Tachibana *et al.*, 2013). De plus, elle requiert un grand nombre d'ovules ce qui pose des problèmes éthiques spécifiques. Elle est interdite en France car elle comporte une étape de création d'embryons pour la recherche. Et enfin, elle n'évite pas la destruction d'un embryon humain et les questions éthiques spécifiques liées à cette recherche.

Les cellules souches pluripotentes induites

Partant du constat qu'une cellule spécialisée est capable d'être reprogrammée par transplantation nucléaire dans un ovule, le japonais Shinya Yamanaka a proposé de forcer l'expression d'un nombre limité de facteurs de transcription (FdT) associés à la pluripotence dans une cellule différenciée, pour la dédifférencier vers la pluripotence. Par élimination, il a pu montrer que l'expression du quatuor minimum de FdT Oct4, cMyc, Klf4 et Sox2 pendant environ deux

semaines peut entraîner la reprogrammation complète d'une cellule différenciée en cellule pluripotente. Les cellules obtenues sont appelées *induced Pluripotent Stem Cells* (iPSCs) (Takahashi & Yamanaka, 2006; Yamanaka, 2009). L'épigénome, le transcriptome et le protéome de la cellule spécialisée de départ ont été intégralement transformés d'un état spécialisé vers un état pluripotent. La physiologie et les propriétés fonctionnelles des iPSC sont typiquement celles des cellules souches pluripotentes : expression des FdT caractéristiques tels que Oct4 et Nanog, expression des marqueurs de surface tels que SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 et TRA-1-81, pousse en colonies à bord net, dépendance au bFGF, prolifération intense, et capacité à se différencier en tout type cellulaire. La pluripotence des iPSC a été démontrée aussi bien *in vitro* par des tests de différenciation dirigée qu'*in vivo* dans la souris immunodéprimée NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) par la formation de tératomes comportant des tissus issus des trois feuillets germinaux (*cf. infra*) (Ramirez *et al.*, 2013). Certaines variations dans le nombre et la nature de ces facteurs ont permis de généraliser cette technologie en la rendant applicable à partir de nombreux types cellulaires y compris ceux issus de personnes très âgées et même centenaires (Lapasset *et al.*, 2011). La démonstration qu'il était possible, par une technique relativement facile à mettre en œuvre, d'obtenir des CSP à partir d'un prélèvement d'un individu adulte, a été une découverte majeure. La technologie des iPSC permet donc de produire en laboratoire n'importe quel type cellulaire à partir de cellules de n'importe quel individu, y compris des patients porteurs d'anomalies génétiques, en quantité théoriquement illimitée.

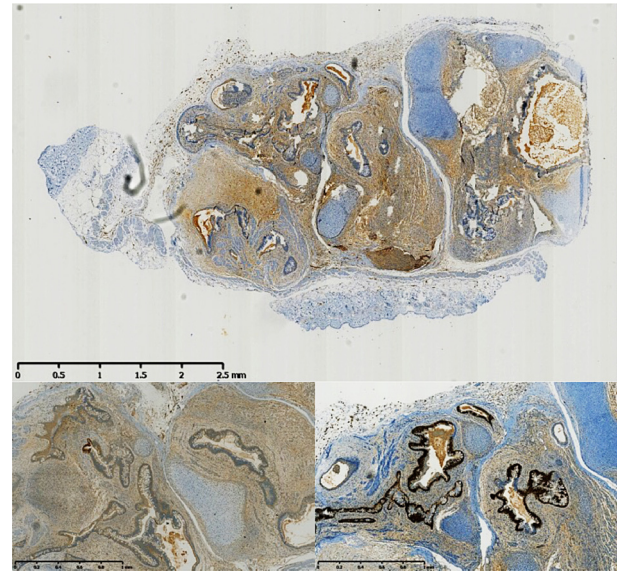
La simplicité et la robustesse de la technologie des iPSC, ainsi que les perspectives scientifiques et médicales des iPSC, ont valu à S. Yamanaka de recevoir le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 2012, conjointement avec John Gurdon (*Science*, 2012).

Différenciation des iPSC

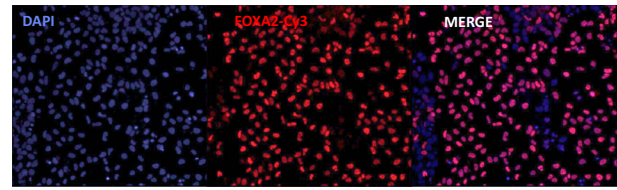
Les CSP se caractérisent par leur capacité à se différencier en tout type cellulaire. Aussi, dès leur découverte, un enjeu majeur fut d'identifier des protocoles pour guider les CSP à se différencier dans la direction recherchée. On peut schématiquement classer les méthodes pour promouvoir la différenciation des CSP en deux catégories : celles basées sur une différenciation spontanée et désordonnée et celles dites « dirigées ». La première catégorie repose sur l'observation que lorsque des CSP forment des agrégats cellulaires, elles se différencient spontanément. Cela

peut être obtenu *in vitro* par culture en suspension et en l'absence de facteurs de croissance. On parle alors de corps embryoïdes (*embryoid bodies*, EB), qui sont constitués de divers tissus mélangés (tissu nerveux, tissu cardiaque, cellules hématopoïétiques, différents épithéliums, *etc.*) (Martin & Evans, 1975). Une autre manière de promouvoir une différenciation spontanée est d'injecter des CSP chez une souris immunodéprimée NSG, ce qui induit la croissance d'un tératome en quelques semaines. Le tératome ainsi obtenu est composé d'un mélange de tissus issus des trois feuillets germinaux, notamment du cartilage, des structures cylindriques tapissées d'épithélium digestif et pulmonaire et des structures neurales, ainsi que de nombreux autres tissus (Figure 1A) (Prokhorova *et al.*, 2009). La formation de tératomes reste la technique de référence pour démontrer formellement la pluripotence d'une lignée de CSP.

La différenciation spontanée est donc avantageuse pour montrer les propriétés de pluripotence, mais cette technique présente l'inconvénient de ne pouvoir conduire à l'obtention majoritaire que d'un seul type cellulaire. La production *in vitro* d'un tissu à partir de CSP et notamment des iPSC tente en effet de récapituler le développement humain normal. C'est pourquoi se sont développées des approches de différenciation dirigée, dont l'ambition est de reproduire *in vitro* les étapes successives du développement d'un tissu en mimant les voies de signalisation auxquelles ces tissus sont physiologiquement soumis au cours de leur développement. Les protocoles initiaux faisaient appel à une première étape de formation d'EB, à des co-cultures avec des cellules fœtales (Roy *et al.*, 2006) ou à des surexpressions de gènes (Kim *et al.*, 2002). Pour simplifier les protocoles et éviter les contaminations par des cellules indésirables ou des modifications génétiques des cellules produites, les protocoles actuels privilégient l'usage exclusif de combinaisons successives de facteurs de croissance, d'inhibiteurs chimiques de certaines voies de transduction et de composants de la matrice extracellulaire. Il est par exemple relativement simple d'obtenir une population quasi pure de cellules de l'endoderme définitif exprimant FoxA2 (Figure 1B) par l'ajout d'activine A et de WNT3A. Un autre exemple est apporté par le système nerveux central, pour lequel une amélioration majeure a été apportée par l'équipe de Lorenz Studer qui a montré que l'inhibition duale de la signalisation SMAD – en bloquant la voie du TGF β et des BMP – conduisait à une différenciation massive et rapide vers des cellules neurales (Chambers *et al.*, 2009). Des protocoles pour la production de très nombreux tissus, y compris des gamètes, ont été publiés. Une synthèse de ces protocoles a été compilée en 2012 par Kevin Eggan (Williams *et al.*, 2012).



(A)



(B)

Fig. 1. Tératome obtenu à partir d'une lignée d'iPSC. (A) Tératome. Analyse immuno-histochimique d'une section de tératome généré par l'injection de la lignée iPSC humaine M4C7 dans une souris immunodéprimée NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG). Marquage par GFAP, marqueur astrocytaire (en haut), par TTF1/NKX2.1, marqueur de progéniteurs bronchiques et neuraux (en bas à gauche) et par CDX2, marqueur notamment de l'épithélium intestinal sous-diaphragmatique (en bas à droite). (B) Marquage FOXA2 par immunofluorescence de CSP différenciées en endoderme définitif par traitement pendant 5 jours par activine A et Wnt3a. Coloration de l'ADN par DAPI.

Les iPSC, un nouveau système modèle pour l'étude des tissus humains

L'immense majorité des tissus primaires ne peut être cultivée *in vitro*. En effet, la mise en culture d'un explant tissulaire se traduit le plus souvent par sa dégénérescence rapide ou au mieux par une croissance limitée dans le temps. Pour ces raisons, l'étude du développement des tissus humains, de leur physiologie et de leurs fonctions au sein des organes dans le cadre de pathologies génétiques provenait essentiellement d'analyses statiques issues de biopsies humaines prélevées à différents stades du développement ou chez

Tableau 1. Applications potentielles des iPSC et comparaison avec celles des CSE.

	iPSC	CSE
Étude de la modification du destin cellulaire	X	
Étude <i>in vitro</i> du développement humain normal	X	X
Étude <i>in vitro</i> du développement humain dans le contexte d'une pathologie génétique ou d'un génotype particulier (exemple : individus acétyleurs lents ou rapides)	X	
Étude <i>in vitro</i> des tissus humains normaux	X	X
Étude <i>in vitro</i> des pathologies génétiques	X	
Criblage pharmacologique à grande échelle sur du tissu humain	X	X
Criblage pharmacologique à grande échelle sur des tissus humains du génotype souhaité	X	
Production de cellules et de tissus pour de la thérapie cellulaire	X	X
Production de cellules et de tissus <i>autologues</i> pour de la thérapie cellulaire	X	
Rajeunissement cellulaire	X	

l'adulte, complétées par l'étude du développement des tissus *in vivo* chez l'animal, notamment sur les modèles génétiques des souris *knock-out* et des souris transgéniques. Les cellules ES puis les iPSC ont bouleversé ce paysage en apportant une solution technique au développement des tissus humains *in vitro*. Les perspectives apportées par ce bouleversement peuvent-être classées en trois grandes catégories : (i) étude *in vitro* du développement et du fonctionnement des tissus normaux et pathologiques humains; (ii) production de cellules et de tissus, potentiellement autologues, pour une médecine régénérative; (iii) un rajeunissement extrême de la cellule âgée et/ou sénescence. Les applications potentielles des iPSC sont précisées et comparées avec celles apportées par les ES dans le Tableau 1. Plusieurs revues détaillent ce potentiel, notamment dans le domaine de la pharmacologie pour déterminer l'efficacité ou la toxicité des molécules chimiques candidates à un usage clinique (Kolaja, 2014), ou l'utilisation des iPSC pour la médecine régénératrice (Fox *et al.*, 2014). La technologie CRISPR/Cas9 a ajouté un potentiel supplémentaire en permettant de produire, à partir des iPSC issues d'un donneur porteur d'une mutation génétique, la lignée iPSC témoin isogénique dans laquelle la mutation a été réparée (Chang *et al.*, 2015).

L'étude des tissus *via* les iPSC se heurte cependant à deux limitations : (i) le degré de maturité des tissus obtenus et (ii) la possibilité de produire un tissu complexe (point abordé au chapitre suivant). La production *in vitro* d'un tissu à partir de CSP tente en effet de récapituler, comme nous l'avons pointé plus haut, le développement humain normal. Pour la majorité des tissus, les protocoles de différenciation *in vitro* actuels parviennent à un stade foetal mais pas à un stade adulte. Il est ainsi notoire que les CSP se différencient en cellules hépatocytaires ou plutôt *hepatocyte-like* qui

expriment un niveau d'albumine inférieur à celui des hépatocytes adultes et un profil de cytochrome p450 de type foetal (Funakoshi *et al.*, 2011). Un autre exemple illustrant ce point est l'impossibilité, en l'état actuel des protocoles de différenciation, d'obtenir *in vitro* le basculement d'une hémoglobine foetale vers une hémoglobine adulte au cours de la production de globules rouges à partir d'iPSC alors que l'injection de progéniteurs issus d'iPSC dans la « niche hématopoïétique » adulte murine permet cette conversion (Kobari *et al.*, 2012).

Production de tissus en 3D *in vitro*

La majorité des protocoles actuels de différenciation est basée sur une culture des tissus en deux dimensions (2D), comportant une ou un nombre limité de couches cellulaires. Or les tissus sont des ensembles cellulaires plus complexes, se développant et fonctionnant en trois dimensions (3D). Même les épithéliums les plus simples, monocouche cellulaire reposant sur une lame basale, développent une relation étroite avec le tissu sous-épithélial et leur fonctionnement normal est lié à ce tissu sous-jacent. Les protocoles de différenciation actuels des CSP aboutissant à des tissus en 2D ne reproduisent donc qu'imparfaitement les tissus humains. Les EB sont une exception, mais leur différenciation diversifiée et chaotique limite leur utilisation pour produire un tissu précis.

Pour répondre à cette insuffisance, des protocoles visant à produire une réplique de petite dimension d'organes complexes ont été développés. Ces structures 3D flottantes dans le milieu de culture sont appelées « organoïdes » et sont devenues une technique majeure pour mimer *in vitro* le développement normal et pathologique (Takasato *et al.*, 2015). Parmi les exemples les plus spectaculaires, on citera le

développement *in vitro* de la rétine humaine, reproduisant celui de la cupule optique puis de la vésicule optique, et aboutissant à une rétine comportant l'épithélium pigmenté de la rétine, une couche de photorécepteurs comportant cônes et bâtonnets et une couche neuronale incluant cellules ganglionnaires et interneurons (Nakano *et al.*, 2012). Ces structures rétinienne complexes et organisées peuvent être congelées et décongelées ultérieurement pour étude physiologique. Un autre exemple est le développement *in vitro* d'une structure mimant certaines parties du cerveau. Ces structures, appelées « *mini-brain* », reproduisent plusieurs régions du cerveau humain, notamment un cortex comportant différents sous-types de neurones corticaux, et une zone sous-jacente contenant des progéniteurs sous forme de cellules gliales radiales (Lancaster *et al.*, 2013). Le mimétisme du développement cérébral est attesté par la reproduction *in vitro*, grâce à cette approche, de la microcéphalie, une pathologie humaine se traduisant par un défaut prononcé du développement cérébral. En effet, la génération de *mini-brain* à partir d'iPSC dérivées d'un patient atteint d'une forme sévère de microcéphalie par mutations dans le gène *CDK5RAP2* résulte en des *mini-brains* réduits en taille en raison d'une maturation prématurée des progéniteurs neuronaux, et donc un déficit final en neurones matures. De plus, ce phénotype a été reproduit en réalisant un *knock-down* du gène *CDK5RAP2* par shRNA à partir d'iPSC issues d'un donneur sain. D'autres exemples, reflétant le développement d'autres organes, ont été rapportés dans la littérature récente, notamment la production de sphéroïdes pulmonaires comportant un épithélium alvéolaire et mimant les structures distales du poumon et comprenant des cellules alvéolaires de type II porteuses de corps lamellaires dans lesquels est stocké le surfactant (Gotoh *et al.*, 2014). Un autre exemple est la génération d'organoïdes mimant le développement et la physiologie de la muqueuse gastrique. Ces organoïdes gastriques peuvent être infectés par *Helicobacter pylori* et reproduire ainsi *in vitro* une pathologie gastrique d'importance clinique majeure (McCracken *et al.*, 2014). Des organoïdes dérivés des CSP reproduisant des parties d'organes ont également été décrits pour le rein (Takasato *et al.*, 2015), l'intestin grêle (Watson *et al.*, 2014), ou le foie (Takebe *et al.*, 2013) et le pancréas exocrine (Huang *et al.*, 2015).

Production de tissus humains *in vivo* dans l'animal

Cependant, malgré l'intérêt considérable que suscitent les organoïdes dérivés des CSP, certaines différences persistent par rapport aux tissus *in vivo*. Le défaut le plus notable est l'absence de microvascularisation. En effet, tout tissu, à l'exception du cartilage et des

tissus transparents de l'œil, est parcouru d'un réseau plus ou moins dense de capillaires. Ces vaisseaux apportent oxygène et nutriments au cœur des tissus et permettent l'évacuation du gaz carbonique et des déchets métaboliques, mais pourraient également directement contribuer au développement de certains tissus (Armulik *et al.*, 2011). L'absence de microvascularisation est donc un frein au développement d'organoïdes de grandes tailles, en raison de la nécrose qui survient en leur centre. Pour pallier cette insuffisance, certains auteurs ont proposé d'utiliser l'impression cellulaire 3D, afin de déposer de manière précise des cellules de différents sous-types, y compris des cellules endothéliales (Collins, 2014). La faisabilité à court terme de cette approche, qui mérite d'être explorée, reste cependant incertaine pour plusieurs raisons : (i) les connections intercellulaires, qui se mettent en place au cours du développement, pourraient avoir du mal à se mettre en place *a posteriori* ; (ii) les différents sous-types cellulaires et les différents degrés de maturité qui sont impliqués dans un tissu donné sont complexes et seront difficiles à reproduire ; et (iii) il sera difficile de rendre fonctionnelle la microcirculation. Pour ce dernier point, il convient de souligner que pour produire une microcirculation fonctionnelle, il faudrait non seulement construire les capillaires, structures cylindriques étanches – ce qui paraît déjà un obstacle difficile à franchir par impression cellulaire 3D – mais il faudrait, en outre, positionner des globules rouges (GR) à l'intérieur de ces vaisseaux, les oxygéner et les faire circuler sous pression. Répondre à ce quadruple cahier des charges (créer le vaisseau, le remplir, oxygéner le contenu et le faire circuler sous pression) est un défi qui sera très difficile à relever *in vitro*. En revanche, c'est exactement ce qui se produit au cours de tout développement normal d'un organe chez le vivant. Aussi, l'environnement le plus adapté à une différenciation des CSP humaines – mis à part l'être humain lui-même – est l'animal. Comme décrit précédemment, la différenciation de CSP dans l'animal se fait classiquement par l'induction de tératomes en les injectant à des souris profondément immunodéprimées NSG. Mais des approches plus sophistiquées permettent d'orienter la différenciation dans une voie spécifique, et par exemple d'obtenir des organoïdes hépatiques humains vascularisés et connectés à la circulation murine (Takebe *et al.*, 2013). Les perspectives dans le traitement des insuffisances hépatiques sont notables. Récemment, une autre stratégie a été proposée, qui vise, *via* la création d'organismes chimères animal/humain, à produire des organes humains structurés dans des animaux porteurs. La preuve de concept a été apportée chez le petit animal à faible divergence évolutive par l'équipe de Hiromitsu Nakauchi en 2010 en injectant des iPSC de rat à des embryons de souris au stade

de blastocyste (Kobayashi *et al.*, 2010). Les souris obtenues par cette approche comportent un contingent significatif de cellules de rats. Ce qui est particulièrement remarquable est que ces iPSC de rat sont capables de permettre la survie des souris *pdx1*^{-/-} dont le gène *pdx1*, nécessaire au développement du pancréas a été invalidé, en complétant la fonction défaillante. Les souriceaux vivants produisent alors de l'insuline et leur pancréas est formé de cellules de rat. Ce travail montre qu'il est possible de créer un animal porteur d'un organe d'une autre espèce animale. Si on extrapole cette stratégie au couple porc/humain, il serait concevable de créer des porcs porteurs d'organes humains tels qu'un pancréas, un cœur ou un foie (Rashid *et al.*, 2014). Les applications médicales d'une telle approche sont nombreuses, en particulier la production d'organes humains pour la transplantation d'organes. Bien sûr, de nombreux obstacles restent à lever, notamment s'assurer que les voies de signalisation développementales soient suffisamment conservées entre le porc et l'humain, développer des stratégies pour prévenir le risque de transmission de zoonoses à l'homme, en particulier des rétrovirus porcins (Yang *et al.*, 2015), et bien sûr résoudre les objections éthiques que cette approche soulève, notamment prévenir les risques d'humanisation de certaines parties du porc (cerveau, face, gonades, *etc.*) (Giquel *et al.*, 2015).

Critiques de la technologie iPSC

Après l'euphorie qui a suivi la découverte de la technologie des iPSC (Cibelli, 2007), des critiques se sont élevées, accusant les iPSC de biais épigénétiques pouvant modifier leurs propriétés (notamment leurs capacités de différenciation) mais également d'altérations de leur patrimoine génétique (Kim *et al.*, 2010; Pera, 2011; Bai *et al.*, 2013). Avec le recul, il apparaît que les variations épigénétiques ou les anomalies génomiques ne sont pas systématiquement retrouvées, et pourraient dépendre de la qualité des protocoles de reprogrammation (Carey *et al.*, 2011; Yamanaka, 2012; Bai *et al.*, 2013). S'il existe une grande variabilité dans les capacités de différenciation des CSP, cette variabilité n'est pas spécifique aux iPSC mais partagée avec les CSE (Osafune *et al.*, 2008) et semble relever du polymorphisme génétique (Rouhani *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2015). Ainsi, les iPSC apparaissent aujourd'hui comme l'équivalent biologique des CSE, ne différant que par leur origine, sous réserve d'utiliser des protocoles optimisés de reprogrammation (Vallier, 2015).

Conclusion

Les iPSC représentent une technologie révolutionnaire de la biologie. Sur le plan fondamental, elles ont

démontré que le destin cellulaire imposé par la différenciation ou le vieillissement sont entièrement réversibles par la simple surexpression transitoire de gènes de la pluripotence. Sur le plan des biotechnologies, les iPSC apportent des outils profondément innovants, pour la modélisation *in vitro* des tissus normaux ou pathologiques porteurs de maladies génétiques, ou encore pour la production de cellules voire de tissus ou d'organes pour la médecine régénératrice. Certaines applications telles que la production de tissus *in vitro* à des fins de recherche sont déjà bien établies, tandis que d'autres, telles que le criblage de nouveaux médicaments ou la production de cellules et de tissus, pour la thérapie cellulaire, sont encore au stade du développement.

Références

- Armulik, A., Genové, G., and Betsholtz, C. (2011). Pericytes : developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, 21, 193-215.
- Bai, Q., Desprat, R., Klein, B., Lemaitre, J.-M., and De Vos, J. (2013). Embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells? A DNA integrity perspective. *Curr Gene Ther*, 13, 93-98.
- Carey, B.W., Markoulaki, S., Hanna, J.H., Faddah, D.A., Buganim, Y., Kim, J., Ganz, K., Steine, E.J., Cassady, J.P., Creighton, M.P., Welstead G.G., Gao Q., and Jaenisch R. (2011). Reprogramming factor stoichiometry influences the epigenetic state and biological properties of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 9, 588-598.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*, 27, 275-280.
- Chang, C.-W., Lai, Y.-S., Westin, E., Khodadadi-Jamayran, A., Pawlik, K.M., Lamb, L.S., Goldman, F.D., and Townes, T.M. (2015). Modeling Human Severe Combined Immunodeficiency and Correction by CRISPR/Cas9-Enhanced Gene Targeting. *Cell Rep*, 12, 1668-1677.
- Choi, J., Lee, S., Mallard, W., Clement, K., Tagliacuzzi, G.M., Lim, H., Choi, I.Y., Ferrari, F., Tsankov, A.M., Pop, R., Lee G., Rinn J.L., Meissner A., Park P.J., and Hochedlinger K. (2015). A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nat Biotechnol*, 33, 1173-1181.
- Cibelli, J.B. (2007). Development. Is therapeutic cloning dead? *Science*, 318, 1879-1880.
- Collins, S.F. (2014). Bioprinting is changing regenerative medicine forever. *Stem Cells Dev*, 23, 79-82.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156.

- Fox, I.J., Daley, G.Q., Goldman, S.A., Huard, J., Kamp, T.J., and Trucco, M. (2014). Stem cell therapy. Use of differentiated pluripotent stem cells as replacement therapy for treating disease. *Science*, 345, 1247391-1247391.
- Funakoshi, N., Duret, C., Pascucci, J.-M., Blanc, P., Maurel, P., Daujat-Chavanieu, M., and Gerbal-Chaloin, S. (2011). Comparison of hepatic-like cell production from human embryonic stem cells and adult liver progenitor cells: CAR transduction activates a battery of detoxification genes. *Stem Cell Rev Rep*, 7, 518-531.
- Giquel, C., De Vos, J., and Bourret, R. (2015). *Creation of chimeric animals bearing human organs*. Médecine et Droit. Elsevier Masson France, pp. 1-11.
- Gotoh, S., Ito, I., Nagasaki, T., Yamamoto, Y., Konishi, S., Korogi, Y., Matsumoto, H., Muro, S., Hirai, T., Funato, M., Mae S., Toyoda T., Sato-Otsubo A., Ogawa S., Osafune K., and Mishima M. (2014). Generation of Alveolar Epithelial Spheroids via Isolated Progenitor Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 3, 394-403.
- Huang, L., Holtzinger, A., Jagan, I., BeGora, M., Lohse, I., Ngai, N., Nostro, C., Wang, R., Muthuswamy, L.B., Crawford, H.C., Arrowsmith C., Kalloger S.E., Renouf D.J., Connor A.A., Cleary S., Schaeffer D.F., Roehrl M., Tsao M.S., Gallinger S., Keller G., and Muthuswamy S.K. (2015). Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat Med*, 21, 1364-1371.
- Kim, J.-H., Auerbach, J.M., Rodríguez-Gómez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S.-H., Nguyen, J., Sánchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K., and McKay, R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, 418, 50-56.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., Yabuuchi A., Takeuchi, A., Cunniff, K.C., Hongguang H., McKinney-Freeman, S., Naveiras, O., Yoon, T.J., Irizarry, R.A., Jung, N., Seita, J., Hanna, J., Murakami, P., Jaenisch, R., Weissleder, R., Orkin, S.H., Weissman, I.L., Feinberg, A.P., and Daley, G.Q. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 467, 285-290.
- Kobari, L., Yates, F., Oudrhiri, N., Francina, A., Kiger, L., Mazurier, C., Rouzbeh, S., Nemer, El, W., Hebert, N., Giarratana, M.-C.C., François S., Chapel A., Lapillonne H., Luton D., Bennaceur-Griscelli A., and Douay L. (2012). Human induced pluripotent stem cells can reach complete terminal maturation : in vivo and in vitro evidence in the erythropoietic differentiation model. *Haematologica*, 97, 1795-1803.
- Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Hamanaka, S., Kato-Itoh, M., Yamazaki, Y., Ibata, M., Sato, H., Lee, Y.-S., Usui, J.-I., Knisely, A.S., Hirabayashi M., and Nakauchi H. (2010). Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell*, 142, 787-799.
- Kolaja, K. (2014). Stem cells and stem cell-derived tissues and their use in safety assessment. *J Biol Chem*, 289, 4555-4561.
- Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501, 373-379.
- Lapasset, L., Milhavel, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Ait-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.M., De Vos, J., Lehmann, S., and Lemaitre, J.M. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev*, 25, 2248-2253.
- Martin, G.R., and Evans, M.J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells : formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72, 1441-1445.
- McCracken, K.W., Catá, E.M., Crawford, C.M., Sinagoga, K.L., Schumacher, M., Rockich, B.E., Tsai, Y.-H., Mayhew, C.N., Spence, J.R., Zavros, Y., and Wells J.M. (2014). Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*, 516, 400-404.
- Nakano, T., Ando, S., Takata, N., Kawada, M., Muguruma, K., Sekiguchi, K., Saito, K., Yonemura, S., Eiraku, M., and Sasai, Y. (2012). Self-Formation of Optic Cups and Storable Stratified Neural Retina from Human ESCs. *Cell Stem Cell*, 10, 771-785.
- Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R.J., Fitz-Gerald, C.S., Sato, Y., Cowan, C.A., Chien, K.R., and Melton, D.A. (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol*, 26, 313-315.
- Pera, M.F. (2011). Stem cells : The dark side of induced pluripotency. *Nature*, 471, 46-47.
- Prokhorova, T.A., Harkness, L.M., Frandsen, U., Ditzel, N., Schröder, H.D., Burns, J.S., and Kassem, M. (2009). Teratoma formation by human embryonic stem cells is site dependent and enhanced by the presence of Matrigel. *Stem Cells Dev*, 18, 47-54.
- Ramirez, J.M., Bai, Q., Dijon-Grinand, M., Assou, S., Gerbal-Chaloin, S., Hamamah, S., and De Vos, J. (2010). Human pluripotent stem cells : From biology to cell therapy. *World J Stem Cells*, 2, 24-33.
- Ramirez, J.M., Bai, Q., Pequignot, M., Becker, F., Kassambara, A., Bouin, A., Kalatzis, V., Dijon-Grinand, M., and De Vos, J. (2013). Side scatter intensity is highly heterogeneous in undifferentiated pluripotent stem cells and predicts clonogenic self-renewal. *Stem Cells Dev*, 22, 1851-1860.
- Rashid, T., Kobayashi, T., and Nakauchi, H. (2014). Revisiting the Flight of Icarus : Making Human Organs from PSCs with Large Animal Chimeras. *Cell Stem Cell*, 15, 406-409.
- Rouhani, F., Kumasaka, N., de Brito, M.C., Bradley, A., Vallier, L., and Gaffney, D. (2014). Genetic background drives transcriptional variation in human induced pluripotent stem cells. *PLoS Genet*, 10, e1004432.

- Roy, N.S., Cleren, C., Singh, S.K., Yang, L., Beal, M.F., and Goldman, S.A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med*, 12, 1259-1268.
- Science, A.A.F.T.A.O. (2012). Nobel Prize in physiology or medicine. Reprogrammed cells earn biologists top honor. *Science*, 338, 178-179.
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanaudomchai, H., Masterson K., Larson J., Eaton D., Sadler-Fredd K., Battaglia D., Lee D., Wu D., Jensen J., Patton P., Gokhale S., Stouffer R.L., Wolf D., and Mitalipov S. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 153, 1228-1238.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-676.
- Takasato, M., Er, P.X., Chiu, H.S., Maier, B., Baillie, G.J., Ferguson, C., Parton, R.G., Wolvetang, E.J., Roost, M.S., Chuva de Sousa Lopes, S.M., and Little M.H. (2015). Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*, 526, 564-568.
- Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.-R., Ueno, Y., Zheng, Y.-W., Koike, N., Aoyama S., Adachi Y., and Taniguchi H. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 499, 481-484.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-1147.
- Vallier, L. (2015). Putting induced pluripotent stem cells to the test. *Nat Biotechnol*, 33, 1145-1146.
- Vogel, G. (2007). Nobel Prizes. A knockout award in medicine. *Science*, 318, 178-179.
- Wakayama, T. (2004). On the road to therapeutic cloning. *Nat Biotechnol*, 22, 399-400.
- Watson, C.L., Mahe, M.M., Múnera, J., Howell, J.C., Sundaram, N., Poling, H.M., Schweitzer, J.I., Vallance, J.E., Mayhew, C.N., Sun, Y., Grabowski G., Finkbeiner S.R., Spence J.R., Shroyer N.F., Wells J.M., and Helmrath M.A. (2014). An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med*, 20, 1310-1314.
- Williams, L.A., Davis-Dusenbery, B.N., and Eggan, K.C. (2012). SnapShot : Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Cell*, 149, 1174-1174.e1.
- Yamanaka, S. (2009). Ekiden to iPS Cells. *Nat Med*, 15, 1145-1148.
- Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells : past, present, and future. *Cell Stem Cell*, 10, 678-684.
- Yang, L., Guell, M., Niu, D., George, H., Lesho, E., Grishin, D., Aach, J., Shrock, E., Xu, W., Poci, J., Cortazio R, Wilkinson RA, Fishman JA, and Church G. (2015). Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*, 350, 1101-1104.