

iPS : des erreurs de jeunesse ?

Bai Qiang, Samir Hamamah, John De Vos

Institut de recherche en biothérapie, Inserm U1040,
Hôpital Saint-Éloi, 80, avenue A. Fliche,
34295 Montpellier, France.
john.devos@inserm.fr



La lune de miel

La reprogrammation cellulaire métamorphose *in vitro* des cellules adultes en cellules similaires aux cellules souches embryonnaires, appelées cellules souches pluripotentes induites (iPS) [1]. Cette transformation est accomplie par l'expression forcée et transitoire de quatre facteurs de transcription (OCT4, SOX2, KLF4 et CMYC) qui vont provoquer un profond remaniement de l'organisation de la chromatine et du programme d'expression génique. La découverte des iPS a profondément bouleversé le champ de la plasticité cellulaire. De très nombreuses applications des iPS ont été proposées, aux enjeux médicaux et scientifiques majeurs. On peut classer ces applications en quatre catégories : (1) une modélisation du développement humain dès le stade embryonnaire ; (2) une modélisation *in vitro* des maladies génétiques ; (3) une source de cellules proches des cellules primaires humaines, normales et pathologiques, pour le criblage de nouveaux médicaments ; (4) une source de cellules autologues et « rajeunies » pour une médecine régénératrice (→) [15]. La démonstration *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal de la faisabilité de tous ces concepts a fait l'objet de très nombreuses publications dans les plus prestigieux journaux [2].

(→) Voir l'article de Charles Nicaise et al. page 799 de ce numéro

La défiance

Depuis la description des iPS, leur identité avec les cellules souches embryonnaires (ES, *embryonic stem*) fait débat. Cette question est loin d'être futile : les iPS sont-elles vraiment le modèle physiologique de développement embryon-

naire précoce qu'elles prétendent être ? Les iPS sont-elles des cellules normales, ou bien une aberration de laboratoire, et potentiellement dangereuses ? Il est clairement établi que les iPS sont des lignées de cellules souches pluripotentes, exprimant les marqueurs de la pluripotence et capables de se différencier en n'importe quel type cellulaire. Certes, la première version des iPS murines ne formait, après injection dans le blastocyste, que des souriceaux chimères non viables [3]. Mais une modification mineure du protocole de reprogrammation – changement du marqueur de sélection qui était alors utilisé – avait suffi pour obtenir des souriceaux viables et capables de transmettre le patrimoine génétique des iPS à la génération suivante *via* leurs gamètes. La question de l'identité entre ES et iPS était alors passée au second plan.

Voilà six mois que le débat est revenu sur le devant de la scène, avec une très forte charge contre les iPS. De nombreux défauts leur sont reprochés. Au-delà d'une ressemblance globale avec les ES, les iPS se distinguaient sur les plans épigénétique, immunologique et génétique. Un des premiers défauts qui avait été relevé était la difficulté à établir des souris par complémentation de blastocystes tétraploïdes, le test ultime de la pluripotence. Mais finalement ce test a pu être réalisé, démontrant qu'il était possible d'obtenir à partir d'iPS murines des souris intégralement composées de tissus issus des iPS [4, 15]. Le taux de succès de ce test était plus faible que pour les ES, suggérant la présence d'anomalies épigénétiques dans un certain nombre de lignées iPS. Ces anomalies ont été confirmées par plusieurs travaux qui viennent de montrer que le remodelage

chromatinien massif qui accompagne la reprogrammation cellulaire était souvent entaché d'anomalies. Par exemple, le profil de méthylation de l'ADN pouvait montrer un profil résiduel caractéristique de la cellule de départ et, inversement, des méthylations aberrantes apparues au cours de la reprogrammation [5, 6]. Ces anomalies touchent particulièrement le locus *Dkl1-Dio3* qui est éteint de manière aberrante dans de nombreux clones iPS. La réactivation de ce locus par intervention chimique restaure la capacité des clones iPS à induire des souris chimères par complémentation de blastocystes tétraploïdes [2]. Ces anomalies épigénétiques se traduisent également par un biais dans la capacité de différenciation des cellules : si les iPS sont dérivées de fibroblastes, la différenciation en cartilage ou os est favorisée par rapport aux lignages sanguins, et réciproquement, si les iPS sont dérivées de cellules sanguines, la différenciation en cellules sanguines est favorisée. Pour expliquer ces anomalies, il a été suggéré que les iPS conservent une mémoire du paysage chromatinien de la cellule de départ (mémoire épigénétique). Plus inattendue a été l'observation récente que dans un modèle allogénique murin les lignées iPS étaient plus immunogéniques que des lignées ES (→) [17].

(→) Voir Brève, m/s n° 8-9, août-septembre 2011, page 715

Des lignées ES d'un fond génétique B6 formaient des tératomes sans rejet dans des souris B6 non immunodéprimées, tandis que des lignées iPS B6 formaient des tératomes de taille inférieure, infiltrés par des lymphocytes T [7]. La première explication avancée par les auteurs est l'expression aberrante d'un

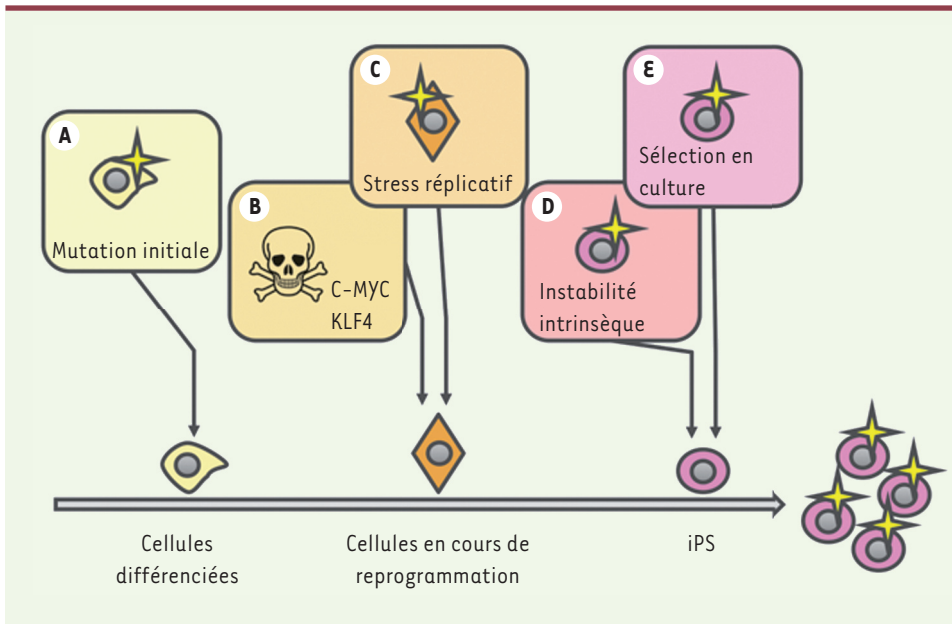


Figure 1. Les différentes causes possibles des anomalies génétiques rapportées dans les iPS. A. Certaines mutations ou variations du nombre de copies d'ADN (CNV) peuvent préexister dans les cellules différenciées avant la reprogrammation, soit comme un polymorphisme partagé par toute la population cellulaire, soit comme une mutation présente dans une sous-population qui pourrait être sélectionnée au cours de la reprogrammation. B, C. L'utilisation de vecteurs intégratifs, la reprogrammation elle-même ou bien l'emploi de certains oncogènes comme c-Myc ou Klf4 peut entraîner un stress réplcatif qui provoque des cassures de l'ADN qui dépassent la capacité de réparation de l'ADN des cellules. D, E. La culture des cellules souches pluripotentes *in vitro* favorise la sélection de sous-clones porteurs de remaniements chromosomiques qui leur confèrent un avantage sélectif de survie ou de prolifération. Ces remaniements chromosomiques apparaissent spontanément ou pourraient être favorisés par une instabilité chromosomique accrue des cellules souches pluripotentes cultivées *in vitro*.

petit groupe de gènes, dont les gènes *Hormad1* et *Zgl6*, qui ne sont pas exprimés au cours du développement normal et se comportent chez la souris adulte comme des antigènes mineurs d'histocompatibilité et qui sont exprimés de manière aberrante dans les lignées iPS [7]. L'autre cause possible de ces rejets immunologiques des iPS est l'existence de mutations dans les parties codantes des gènes.

Ceci nous amène au troisième reproche fait au iPS, le plus grave : la présence d'anomalies génétiques. Il était déjà connu que les cellules souches embryonnaires, murines ou humaines, pouvaient acquérir des anomalies génétiques au cours de la culture *in vitro* et que ce défaut était partagé par les iPS. Mais plusieurs rapports récents montrent que les iPS présentent des mutations et

des variations du nombre de copies d'ADN (CNV) dès les premiers stades de leur genèse. Ces anomalies génétiques posent le problème de leur innocuité pour une éventuelle utilisation en clinique. Que l'on analyse les iPS par le caryotype ou par des analyses génomiques plus pointues comme le séquençage haut débit ou les puces à ADN, on relève que les iPS présentent des anomalies génétiques multiples : mutations dans les parties codantes des gènes (en moyenne 6 mutations par lignée comparé au fibroblaste de départ) ou changements de CNV (en moyenne deux fois plus que le fibroblaste de départ) [8, 9]. Il est intéressant de noter que les anomalies de CNV sont plus notables au cours des tout premiers passages (passages 5 et 10) puis diminuent au cours de la culture, suggérant un désa-

vantage sélectif pour nombre de ces anomalies [9]. Ces anomalies pourraient avoir été générées par l'utilisation des vecteurs intégratifs (rétrovirus ou lentivirus) qui sont encore la méthode de reprogrammation la plus utilisée (Figure 1), mais elles sont aussi observées avec des techniques non intégratives [8]. Une autre explication pourrait être que la reprogrammation crée un stress réplcatif qui serait à l'origine des aberrations génétiques. Effectivement, un certain nombre des altérations de l'ADN se concentrent dans des régions fragiles du génome connues pour être altérées en cas de stress réplcatif, lequel peut être induit par un oncogène comme c-myc [10]. Ces observations sont en accord avec le fait que les systèmes de protection du génome contre la transformation maligne - p53, p16/Ink4a et p19/Arf - sont les mêmes qui bloquent en partie la reprogrammation [11]. Enfin, une troisième explication, non exclusive de la précédente, pourrait être une sélection au cours de l'étape de reprogrammation de sous-clones minoritaires qui préexistaient à la reprogrammation, et dont les anomalies génétiques favorisent le succès de la reprogrammation, mais certains résultats semblent infirmer cette hypothèse [8].

La réconciliation ?

Quelle conclusion tirer de ces travaux récents ? Les iPS sont-elles des mutantes au comportement imprévisible et potentiellement dangereux ? En réalité, le tableau n'est peut-être pas si noir que cela. Sur le plan épigénétique, des voix s'élèvent pour dire que les profils des modifications de la chromatine telles que les méthylations des lysines 4 et 27



de l'histone 3 (H3K4me3 et H3K27me3) sont similaires entre ES et iPS et que les quelques différences observées sont de l'ordre de la variabilité naturelle des lignées de cellules souches pluripotentes et ne permettent pas de distinguer les deux types cellulaires [12]. Au congrès de l'ISSCR¹ qui s'est déroulé en juin à Toronto, Rudolf Jaenisch a présenté les résultats de son groupe qui montrent que l'extinction du locus *Dlk1-Dio3* qui avait été observée par une autre équipe [13] est en fait la conséquence d'une stœchiométrie défavorable dans l'expression des quatre facteurs de la reprogrammation. Il montre que dans un système de reprogrammation optimisé cette aberration épigénétique ne s'observe plus. Au même congrès, Shinya Yamanaka a fait remarquer que dans le travail rapportant l'immunogénicité des iPS [7], il manquait une expérience-clé qui consiste à étudier l'immunogénicité des iPS dans un modèle autologue. L'application autologue était initialement l'application la plus attendue des iPS en médecine régénérative [3] ! S. Yamanaka a également montré que dans son laboratoire la variabilité dans la capacité de différenciation des clones iPS qu'il avait produits était similaire à celle qu'il observait au sein d'une collection de lignées ES. Enfin, sur le plan génétique aussi, des voix s'élèvent pour mettre en garde contre une généralisation trop rapide. Un groupe du WiCell Institute vient d'établir dans un travail

titanesque le caryotype de 1700 cellules en culture couvrant 219 lignées d'iPS et 40 lignées ES humaines. L'incidence des anomalies du caryotype est similaire entre iPS et ES : 12,5 % et 12,9 % respectivement [14].

Il donc est encore beaucoup trop tôt pour conclure. Il se pourrait que les anomalies attribuées aux iPS ne soient finalement pas généralisables à toutes les iPS mais soient des cas particuliers reflétant des méthodes non optimales de reprogrammation ou de culture. Il est donc urgent de comprendre les mécanismes intimes à l'origine des anomalies épigénétiques et génétiques observées parfois dans les iPS, afin de pouvoir y remédier. La comparaison avec les cellules ES est à ce titre particulièrement importante pour établir les anomalies qui sont spécifiques aux iPS et celles qui relèvent des cellules souches pluripotentes en général. La recherche sur les ES humaines reste donc particulièrement d'actualité. Les techniques de reprogrammation sont encore loin d'être optimisées et beaucoup de travail reste à faire sur ce plan là. Les altérations épigénétiques et génétiques des iPS qui ont été récemment rapportées ne seraient peut-être que des erreurs de jeunesse ! ♦

Induced pluripotent stem cells: youthful indiscretions


CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

¹ ISSCR : international society for stem cell research.

RÉFÉRENCES

1. Coulombel L. Reprogrammation nucléaire d'une cellule différenciée : on efface tout et on recommence. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 667-70.
2. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 2010 ; 24 : 2239-63.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 ; 126 : 663-76.
4. Zhao X, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009 ; 461 : 86-90.
5. Lapasset L, Milharet O, Lemaître JM. La reprogrammation vers la pluripotence peut-elle effacer la mémoire d'une vie antérieure ? *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 902-3.
6. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011 ; 471 : 68-73.
7. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011 ; 474 : 212-5.
8. Gore A, Li Z, Fung HL, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011 ; 471 : 63-7.
9. Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 2011 ; 471 : 58-62.
10. Pasi CE, Dereli-Öz A, Negrini S, et al. Genomic instability in induced stem cells. *Cell Death Diff* 2011 ; 18 : 745-53.
11. Dijon-Grinand M, De Vos J. P53, ARF et P16 : la ligne Maginot de la reprogrammation cellulaire. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 793-4.
12. Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, et al. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010 ; 7 : 249-57.
13. Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, et al. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010 ; 465 : 175-81.
14. Taapken SM, Nisler BS, Newton MA, et al. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat Biotech* 2011 ; 29 : 313-4.
15. Nicaise C, Bohl D, Pochet P. La transdifférenciation cellulaire au service de la sclérose latérale amyotrophique ? *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 799-801.
16. Coulombel L. Pluripotence : une définition à géométrie variable. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 798-801.
17. Coulombel L. Les iPS : soi ou non-soi ? *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 715.



Tarifs d'abonnement m/s - 2011

Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement page 798 dans ce numéro de m/s

