



14. Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, et al. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res* 2010 ; 70 : 875-82.
15. Fournier G, Garrido-Urbani S, Reymond N, Lopez M. Nectines et nectines-like : marqueurs, acteurs et cibles de l'oncogénèse. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 273-9.
16. Lemay G. Apprivoiser nos ennemis pour en faire des alliés : la « virothérapie » anticancéreuse. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 339-40.
17. Touchefeu Y, Schick U, Harrington KJ. Le virus de la rougeole : un futur traitement en cancérologie ? *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 388-94.

## NOUVELLE

## Transfert nucléaire chez l'homme

### Difficile reprogrammation sept ans après le Cloningate

Laure Coulombel

#### Quinze ans après Dolly et Marguerite

Quatorze ans se sont écoulés depuis la naissance de la brebis Dolly en 1997 [1] et de la vache Marguerite en 1998 à l'Inra, deux mammifères « clonés », c'est-à-dire nés du transfert d'une cellule somatique dans un ovocyte énucléé, dont on a ensuite déclenché les premières divisions embryonnaires. Dolly et Marguerite vécut longtemps et eurent beaucoup d'enfants. Quelques années plus tard étaient obtenues des lignées de cellules souches embryonnaires (CSE) à partir de blastocystes établis par transfert nucléaire (nt) chez la souris [2] - et plus récemment chez des primates non humains [3]. Si aucun obstacle insurmontable ne s'oppose en théorie à la reprogrammation de noyaux somatiques humains par l'environnement de l'ovocyte, ces recherches sont non seulement techniquement très difficiles, mais surtout elles se heurtent aux questions éthiques que soulève la collecte d'ovocytes humains - le « cloningate » de Woo Suk Hwang est encore dans toutes les mémoires [4] - et, dans de nombreux pays dont la France, à l'interdiction de cette technique de transfert nucléaire. Les données publiées sont donc très rares, et ne concernent que le développement jusqu'au stade blastocyste d'un ovocyte énucléé dans lequel un noyau somatique a été transféré [5-7], mais aucune lignée de cellules ntCSE n'en a été dérivée.

L'intérêt même du transfert nucléaire est mis en doute depuis la découverte retentissante par S. Yamanaka que l'expression transitoire de trois ou quatre facteurs de transcription dont Oct4 permet de reprogrammer (presque) n'importe quelle cellule somatique en une cellule souche pluripotente (appelée iPS ou *induced pluripotent stem cell*). Le père de Dolly, Ian Wilmut, avait même proclamé, dans une interview à la BBC en novembre 2007 qui avait fait grand bruit, que le transfert nucléaire n'avait plus aucun intérêt. La reprogrammation par transfert nucléaire est pourtant un exemple plus abouti de reprogrammation que les iPS, puisqu'elle aboutit à un zygote totipotent. Les iPS, comme les cellules ES, étant « seulement » pluripotentes, et incapables - si elles ne sont pas insérées dans un blastocyste hôte [8] - de se développer en un embryon. Ces ntCSE permettraient donc peut-être d'explorer les mécanismes très précoces du développement embryonnaire, ce d'autant que la pluripotence des CSE humaines est probablement assez limitée [8] (→), et pourraient être moins « instables » que les iPS. Ces arguments ont été développés par des scientifiques du CIRM (*California institute for regeneration medicine*) dans un article paru dans *Nature Biotechnology* en août 2011 [9], qui prônait la poursuite de ces recherches.

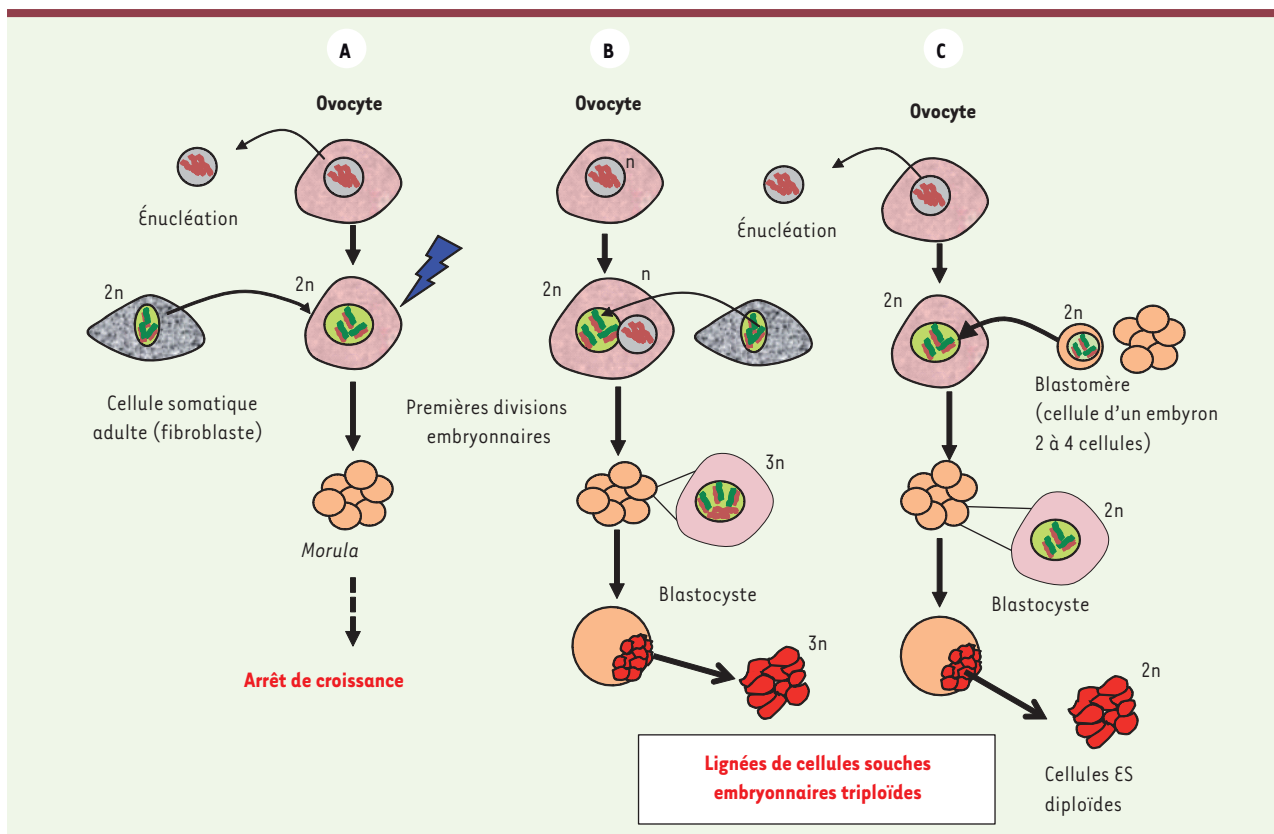
(→) Voir Nouvelle, page 370 de ce numéro

médecine/sciences, 2, rue d'Alésia, 75014 Paris, France.

[laure.coulombel@inserm.fr](mailto:laure.coulombel@inserm.fr)

#### Échec de reprogrammation par transfert nucléaire chez l'homme

Or, deux mois plus tard, en octobre 2011, une équipe new yorkaise publie dans *Nature* [10] la première étude analysant en détail les événements induits par le transfert d'un noyau somatique humain dans un ovocyte humain. La force de ce travail vient du grand nombre d'ovocytes utilisés (n = 270) assurant la reproductibilité des observations [10]. Le débat éthique sur les conditions d'obtention de ces ovocytes est d'ailleurs ouvert par les auteurs dans un article séparé publié dans *Cell Stem Cell* [11] (*voir plus loin*). Les auteurs ont utilisé les conditions classiques du transfert nucléaire : fusion de la cellule fibroblastique (en l'injectant sous la membrane pellucide) avec un ovocyte au stade de métaphase II préalablement énucléé, migration du noyau dans l'ovocyte, activation artificielle de l'ovocyte par ionomycine. Les fibroblastes provenaient ici de deux hommes adultes, un individu normal et un patient diabétique. Tous les ovocytes énucléés et fusionnés avec un fibroblaste puis activés (n = 31) déclenchent bien la première division de clivage mais le développement s'arrête systématiquement au stade 6-10 cellules, et n'aboutit jamais à un blastocyste (*Figure 1A*). Cet échec n'est pas imputable à la technique d'enucléation ou de transfert *per se*, mais en partie à l'âge du noyau. En effet, ce blocage de croissance n'existe pas si le noyau transféré est celui d'une cellule embryonnaire, par exemple



**Figure 1. Schéma du protocole expérimental de transfert nucléaire dans des ovocytes humains.** **A.** Un noyau somatique ( $2n$ ) d'un fibroblaste est inséré dans un ovocyte énucléé. Une activation de l'ovocyte (éclair bleu) déclenche les divisions de clivage de l'embryon. Mais le développement de l'embryon ne dépasse pas le stade de morula. **B.** Contrairement à la procédure suivie en **A**, le noyau de l'ovocyte (haploïde,  $n$ ) est laissé en place. Le reste du protocole est identique à **A**. Dans ce cas, le développement de l'embryon atteint le stade de blastocyste, et la masse interne peut être prélevée et cultivée. Deux lignées de cellules souches embryonnaires en seront dérivées. Le noyau de ces lignées a un génome triploïde ( $2n$  venant du noyau somatique et  $n$  du noyau de l'ovocyte). **C.** Même procédure qu'en **A**, mais le noyau transféré provient d'un embryon (blastomère) et non pas d'une cellule somatique. Dans ces conditions, le développement embryonnaire se fait normalement, et on peut dériver avec succès des lignées de cellules souches embryonnaires diploïdes ( $2n$ ).

un noyau de blastomère<sup>1</sup> (Figure 1C) ou de CSE, comme cela avait été montré précédemment. D'autre part, 76 % des ovocytes contrôles fécondés *in vitro* par un gamète mâle (16/21), et 25 % des 52 ovocytes activés artificiellement sans énucléation (déclenchant un processus de parthénogenèse) se développent en une morula compactée puis en un blastocyste. Que se passe-t-il donc lorsqu'un noyau somatique adulte est substitué au noyau de l'ovocyte ? Ce noyau n'est pas reprogrammé, et est transcriptionnellement « inactif » : au jour 3, il n'exprime ni les gènes spécifiques de son programme antérieur, ni ceux caractéristiques d'un zygote transcriptionnel-

lement actif. Les auteurs montrent que pour déclencher la reprogrammation du noyau de fibroblaste adulte, la présence du génome de l'ovocyte (donc du noyau haploïde) est nécessaire. La démonstration est faite en fusionnant le fibroblaste avec un ovocyte qui n'a pas été énucléé : dans ce cas, les embryons (triploïdes car leur noyau contient le génome somatique diploïde et le génome haploïde de l'ovocyte) atteignent le stade blastocyste dans 21 % des cas (13/63 ovocytes) (Figure 1B). De la masse interne de ces blastocystes triploïdes, les auteurs ont dérivé 2 lignées de cellules ES (une dérivant des noyaux fibroblastiques du patient diabétique et l'autre de l'individu normal). Ces CSE, amplifiées pendant plus de 100 doublings de population en 6 mois, sont également triploïdes, et leur

génom mitochondrial est d'origine exclusivement ovocytaire. Des anomalies chromosomiques sont détectées dans une des deux lignées de CSE. Ces anomalies touchent les chromosomes 12 et 17 classiquement atteints aussi dans les CSE issues de blastocystes préimplantatoires « classiques ». Le profil transcriptomique de ces lignées ntCSE est proche de celui d'autres cellules pluripotentes : lignées de CSE humaines de référence, ou lignées de CSE issues d'embryons parthénogénétiques, ou iPS issues de la reprogrammation des fibroblastes des deux individus dont les noyaux ont été transférés dans les ovocytes. Une prouesse technique basée sur le calcul du rapport (dans l'ADN génomique ou ADNc) des SNP (*single nucleotide polymorphisms*) exprimés par les allèles somatiques ( $\times 2$ ) ou ovocytaires ( $\times 1$ )

<sup>1</sup> On désigne par ce terme les cellules des premières divisions embryonnaires qui, en théorie, sont équivalentes et totipotentes.



permet aux auteurs de distinguer les transcrits d'origine somatique ou ovocytaire dans cet hybride, et apporte la preuve de la reprogrammation du noyau somatique. Une observation importante, qui devra être confirmée, est que la reprogrammation serait « complète », sans qu'il n'y ait trace de « mémoire épigénétique » du fibroblaste d'origine dans le noyau somatique reprogrammé. Cette observation fragmentaire ne permet pas à elle seule d'affirmer que ces cellules ntCSE ont un degré de reprogrammation plus complet que celui des iPS issus des mêmes fibroblastes de peau, mais la question mérite d'être posée.

Il est difficile de prédire si ce type de recherches va ou non se poursuivre : indépendamment des difficiles questions éthiques que soulève la question du don d'ovocytes, l'intérêt scientifique est certain : l'identification des facteurs clés produits par l'ovocyte et les cellules embryonnaires précoces qui sont requis pour la reprogrammation permettrait de définir des conditions de transfert nucléaire efficace en l'absence du génome ovocytaire. Il s'agit probablement de facteurs de transcription maternels présents dans l'œuf non fécondé et le zygote. Le facteur Glis1, récemment identifié comme facilitant la reprogrammation des iPS, est un bon candidat [12].

### Des questions éthiques difficiles, une recherche controversée

Dans un article publié simultanément dans *Cell Stem Cell* [11], les auteurs de l'article de *Nature* discutent le point éthique très délicat du don d'ovocytes à visée de recherche. Une autre prise de position est également publiée, celle de I. Hyun, ancien président du sous-comité de l'ISSCR (*international society for stem cell research*) pour l'utilisation d'éléments du corps humain [13]. Les auteurs posent très clairement le problème de la rétribution des femmes donnant des ovocytes dans le cadre d'un programme de recherche, arguant que ces recherches ne pourront pas être poursuivies si les femmes ne sont pas rétribuées, compte tenu des inconvénients liés à la procédure de recueil. Dans leur article de *Nature*, les auteurs de l'article expliquent

en détail leur démarche : 16 femmes parmi les 252 qui ont participé à un programme de don d'ovocytes initialement dans un objectif de reproduction ont été sélectionnées sur des critères très précis. Toutes ont été dédommagées quelle que soit la destination du don, reproduction ou recherche, et la possibilité d'un don à la recherche n'était jamais proposée d'emblée.

Cette étude a été faite aux États-Unis, pays dans lequel la procédure du don d'ovocytes dans le cadre d'une procédure d'AMP (assistance médicale à la procréation) s'accompagne du versement d'une somme (5 à 8 000 \$) en dédommagement des frais occasionnés, somme qui n'est considérée ni comme un paiement des ovocytes eux-mêmes, ni comme incitant les femmes à prendre des risques. En revanche, si le don d'ovocytes est destiné uniquement à un protocole de recherche, la rétribution des femmes n'est pas autorisée par les bonnes pratiques édictées par *the US National Academy of Science* (NAS) ou par la *California Institute for Regenerative Medicine* (CIRM), et les chercheurs américains financés par l'état fédéral ou le CIRM ne pourront pas utiliser les lignées dérivées par Noggle *et al.* [10]. Au contraire, l'ASRM (*american society for reproductive medicine*) recommande ce dédommagement, que le prélèvement se fasse dans un but reproductif ou de recherche. Le nouveau directeur du CIRM, Alan Trounson – le père du premier bébé « éprouvette » australien – semblerait, lui aussi, adopter une position plus souple que l'attitude initiale prônée par cet institut. Au Royaume-Uni, la HFEA<sup>2</sup> dans un communiqué en date d'octobre 2011 vient de modifier les conditions de dédommagement des femmes donnant des ovocytes, qui reçoivent désormais une somme de 750 £ au lieu de 250 £ précédemment. Cette modification a été approuvée par le *Nuffield Council of Bioethics*, celui-ci allant plus loin dans son rapport et prônant une compensation pour les donneuses d'ovocytes à visée de recherches. Quant à l'ISSCR (un organisme international qui se veut l'expression de la communauté scientifique), ses

recommandations n'approuvent ni d'interdisent explicitement cette rétribution, mais remarquent que les considérations financières ne doivent pas être une incitation au don, ni le paiement fonction du nombre ou de la qualité des ovocytes. En France, le don d'ovocytes comme tous les dons d'éléments du corps humain est encadré par la loi de bioéthique ; celle-ci (révisée en 2011) interdit toute rémunération en contrepartie du don d'ovocytes, les donneuses bénéficiant de la prise en charge des frais occasionnés par le don. Le transfert nucléaire, comme la création d'embryons à visée de recherches, sont interdits par la loi de bioéthique. ♦

### Somatic cell nuclear transfer in human ovocytes

#### CONFLITS D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Wilmut I, Schnieke A, McWhir E, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997 ; 385 : 810-3.
2. Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, *et al.* Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 2001 ; 292 : 740-3.
3. Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, *et al.* Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007 ; 450 : 497-502.
4. Chneiweiss H. Cloning? La publication scientifique et le clonage thérapeutique face à la mystification Hwang. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 218-22.
5. French AJ, Adams CA, Anderson LS, *et al.* Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* 2008 ; 26 : 485-93.
6. Hall VJ, Compton D, Stojkovic P, *et al.* Developmental competence of human *in vitro* aged oocytes as host cells for nuclear transfer. *Hum Reprod* 2007 ; 22 : 52-62.
7. Fan Y, Jiang Y, Chen X, *et al.* Derivation of cloned human blastocysts by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer with  $\beta$ -thalassaemia fibroblasts. *Stem Cells Dev* 2011 ; 20 : 1951-9.
8. Coulombel L. Pluripotence : une définition à géométrie variable. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 798-801.
9. Grieshammer U, Shepard KA, Nigh EA, Trounson A. Finding the niche for human somatic cell nuclear transfer? *Nat Biotechnol* 2011 ; 29 : 701-5.
10. Noggle S, Fung HL, Gore A, *et al.* Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature* 2011 ; 478 : 70-5.
11. Egli D, Chen AE, Saphier G, *et al.* Impracticality of egg donor recruitment in the absence of compensation. *Cell Stem Cell* 2011 ; 9 : 293-4.
12. Maekawa M, Yamaguchi K, Nakamura T, *et al.* Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* 2011 ; 474 : 225-9.
13. Hyun I. Moving human SCNT research forward ethically. *Cell Stem Cell* 2011 ; 9 : 295-7.

<sup>2</sup> Human fertilization embryology authority.