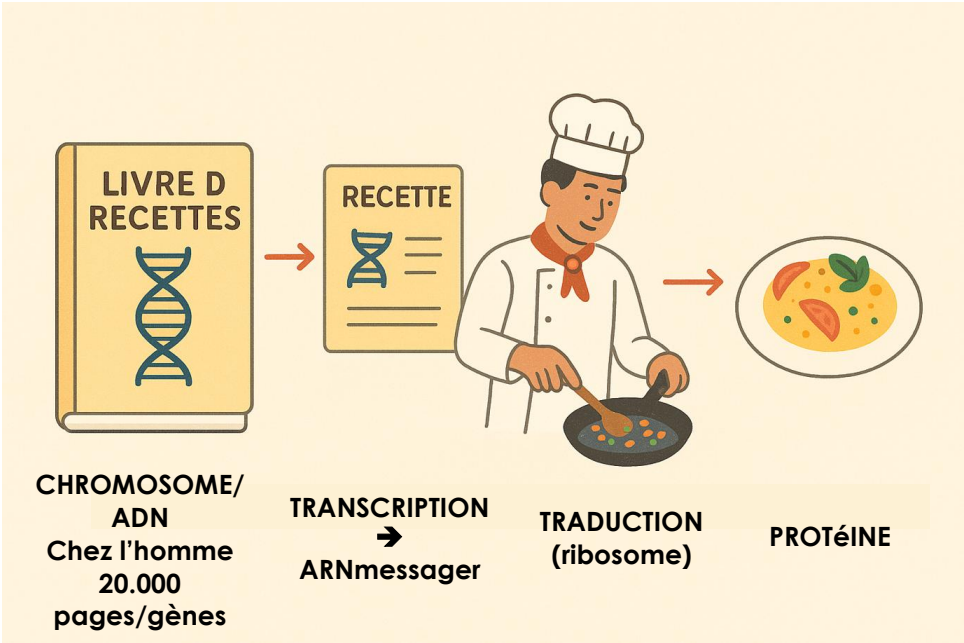
Au cours de ce second cours je vous dirai comment les connaissances issues de l'étude des embryons ont été utilisées en médecine, et tout particulièrement dans le domaine appelé médecine personnalisée ou médecine de précision.

Cette présentation comportera six parties :

1- Quelques rappels des principales notions présentées lors du premier cours.
2- La notion de cellules souches et leur origine.
3- Comment les cellules souches ont pu être utilisées au laboratoire pour générer les organoïdes.
4- Utilisation des organoïdes en médecine dite personnalisée ou de précision.
5- Par extension quelles sont les autres méthodes mises en œuvre dans cette médecine.
6- Quels sont les problèmes éthiques soulevés par les méthodes de médecine personnalisée ?

## Rappels des principales étapes du développement embryonnaire

Le développement des embryons repose en très grande partie sur nos chromosomes. Je vous rappelle donc que nos chromosomes peuvent être comparés à un livre de recettes de 20.000 chapitres, ou encore 20.000 gènes, chaque gène permettant de fabriquer une protéine. Pour fabriquer une protéine, il faut copier une page donnée, ce qui correspond à ce qu'on appelle **la transcription** qui donne des **ARNmessagers**. Chimiquement, un ARNmessager ressemble à l'ADN fait de nucléotides, mais n'a rien à voir avec une protéine qui est constitué d'acides aminés. Pour passer de l'ARNmessager à la protéine il existe une étape dite de traduction suivant un code très précis ; on peut dire que cette étape s'apparente à l'œuvre du cuisinier interprétant une recette, en beaucoup plus précis et fiable, le fourneau étant ce qu'on appelle un **ribosome**. Et au final on obtient une **protéine** correspondant au **gène** de départ.



Je ne détaillerai pas les différentes étapes du développement embryonnaire ; la première étape correspond à la **fécondation**, c'est à dire la rencontre entre les gamètes femelle et mâle. Puis au cours des premières divisions on voit rapidement apparaître des **territoires différents**, préfigurant la tête et la queue en passant par les membres et la colonne vertébrale. Un processus central dans l'apparition de régions différentes et de tissus différentes repose sur la **communication entre les cellules**, leur changement de position (on parle de leur **migration**), et le fait qu'il existe un ordre des processus. Puis une fois que les territoires ont été définis, les cellules s'organisent dans l'espace – on parle de **morphogenèse**.

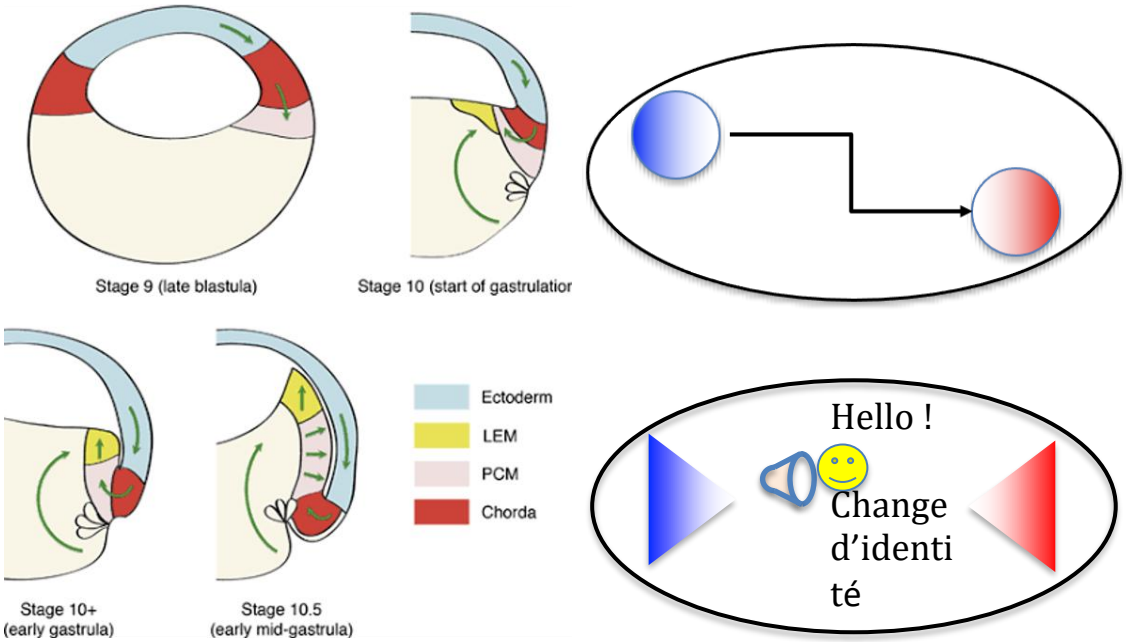
Je vous rappellerai néanmoins qu'il est possible de visualiser ces différentes étapes, en particulier chez des espèces simples telles que le nématode *C. elegans*, un petit ver. Dans cette vidéo vous pouvez observer la migration des pronoyaux l'un vers l'autre, et la première division. Notez que l'ensemble de cette séquence est très dynamique et que les noyaux font une véritable danse. Notez aussi que la première division donne naissance à deux cellules de taille différente, ce qui est la première manifestation de la mise en place progressive de territoires distincts.



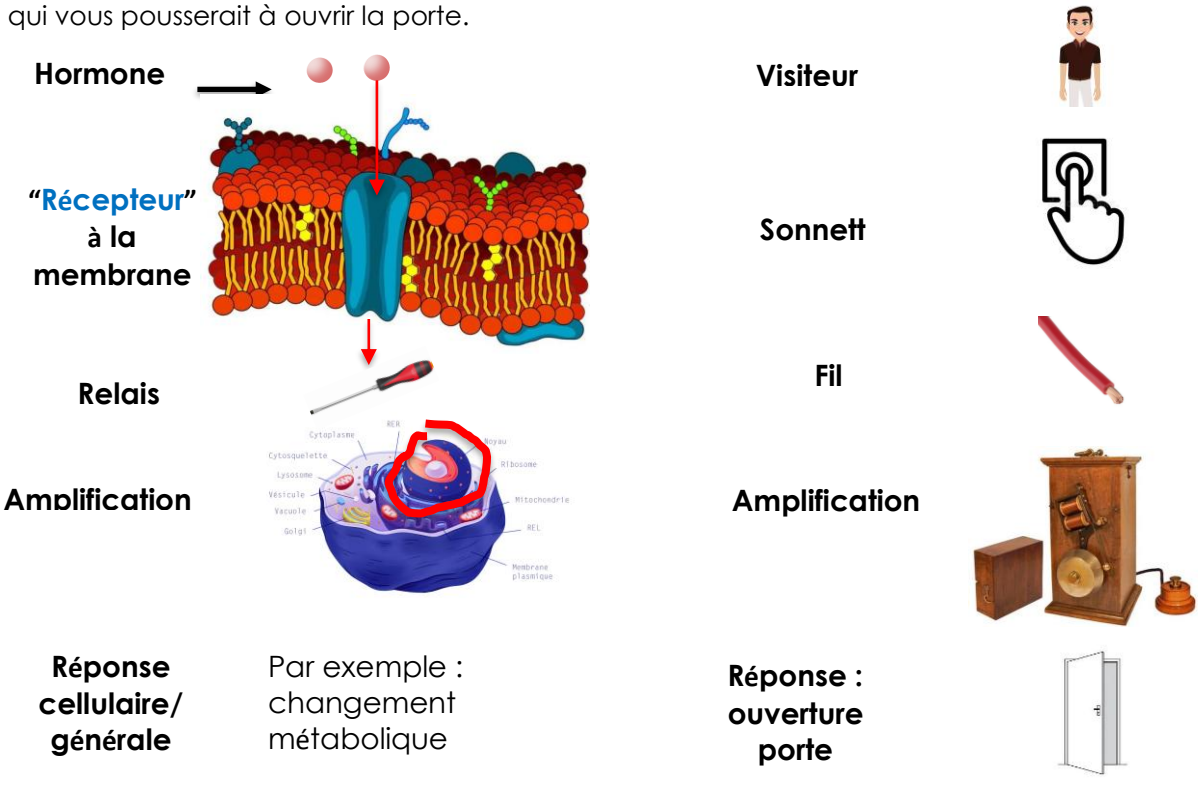

On peut aussi visualiser ces mêmes étapes dans l'embryon précoce de la souris, en utilisant des gènes synthétiques dans lesquelles un des gènes de la souris est fusionné avec le gène est avec des dérives de la protéine fluorescente provenant de la méduse.

Ainsi que je vous le disais à l'occasion du premier cours, l'événement le plus important de notre vie est ni notre conception ou notre naissance, encore moins notre mariage ou notre décès, mais l'étape appelée **gastrulation** au cours de laquelle un grand nombre de cellules localisées au départ à la surface de l'embryon plongent vers l'intérieur de l'embryon. Vous pouvez admirer cette étape d'abord chez un embryon de mouche du vinaigre. Vous pouvez aussi admirer cette étape chez un embryon du crapaud *Xenopus laevis.* Cette étape permet de séparer les principaux tissus entre cellules de surface de la peau plus système nerveux, du squelette plus nos muscles, et des viscères. En fait au moment du passage dans le gouffre elles reçoivent un signal (des signaux) qui orientent ce qu'on appelle leurs **destinées** vers des identités distinctes (muscles, intestin, poumon etc).

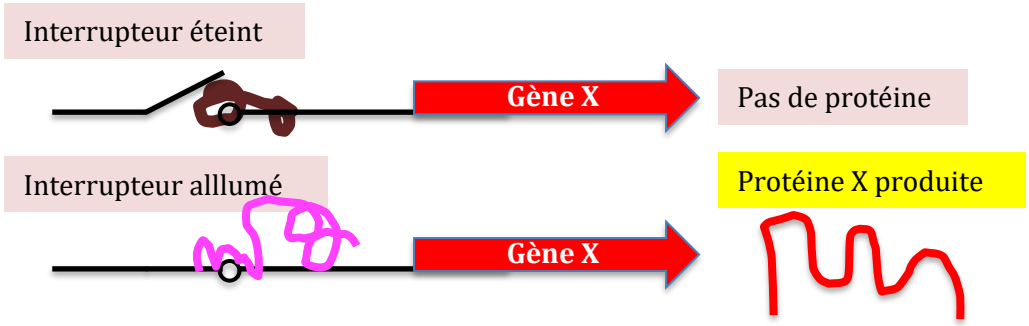
Au cours de cette étape, non seulement les cellules se déplacent vers l'intérieur de l'embryon, on parle de **migration**, mais aussi elles émettent des signaux et **communiquent** entre elles. C'est ce que j'illustre dans le dessin ci-dessous en représentant schématisant l'embryon de crapaud en coupe.




L'aspect de **communication**, on parle aussi de **signalisation**, est primordial dans cette étape comme je vais maintenant le souligner. J'avais dans le cours précédent ais la comparaison entre la communication entre cellules et un visiteur qui viendrait actionner votre sonnette de porte, ce qui vous pousserait à ouvrir la porte.



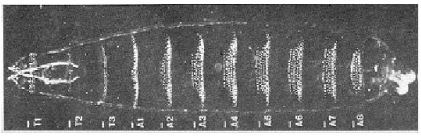
Avant d'aller plus loin et aborder la notion de cellules souches, je dois introduire la notion d'**activité d'un gène**. Nous possédons, comme je l'ai déjà souligné, environ 20.000 gènes, chacune de nos cellules présentant exactement le même jeu de gènes. Cependant, en règle générale, une cellule donnée ne va « photocopier » - on dit « **exprimer** »- qu'un sous-ensemble de ceux-ci. Typiquement, pour faire des poils ou des cheveux, nos cellules de la peau doivent « **exprimer** » le gène de la kératine, mais ce même gène doit être maintenu « **éteint** » dans nos yeux sans quoi vous auriez un problème (c'est même une maladie). Concrètement, devant chaque gène il existe des séquences de nucléotides qui **contrôlent l'activité** de chacun des gènes à l'aide de protéines spécifiques appelées « **facteurs de transcription** » capables de s'attacher à ces séquences pour les maintenir en mode **éteint** (protéine marron dans schéma ci-dessous) ou **exprimé** (grâce à la protéine rose ci-dessous). Au cours de la signalisation dont j'ai parlé juste avant, dans la majorité des cas, le signal vient activer un facteur de transcription particulier. Pour en revenir à ces gènes chimériques avec la protéine fluorescente de la méduse déjà évoqués, on peut aussi visualiser la conséquence du signal en suivant par exemple la présence du facteur de transcription dans le noyau.




Je vais conclure ces rappels en mentionnant à nouveau deux signaux très importants identifiés à l'origine chez la mouche du vinaigre mais qui existent aussi chez les mammifères. Le premier est Wingless appelé ainsi car la perte de ce gène cause la perte des ailes chez la mouche ; le second est Hedgehog – hérisson en anglais – dont la perte affecte l'embryon de la mouche en transformant des zones nues de l'embryon en zones poilues. Ces deux entités correspondent à des protéines secrétées par les cellules qui en diffusant entre cellules voisines vont influencer leur devenir par signalisation.



Gène "***wingless***" – sans ailes



Gène "***hedgehog***" – hérisson





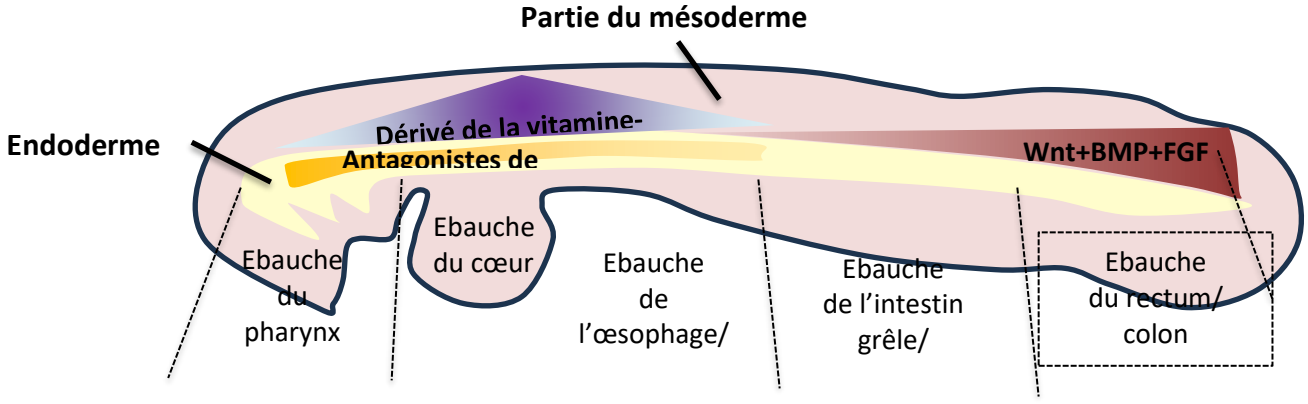
L'équivalent humain de Wingless est appelé Wnt, l'équivalent de Hedgehog est appelé Sonic hedgehog ou Shh. Dans un cas comme dans l'autre, leur perte a des conséquences pour le développement embryonnaire des mammifères, tandis qu'une signalisation non régulée entraine des cancers.

| | |
|---|---|
| Dans l'embryon : | *Wnt* est important pour l'émergence de l'endoderme et l'intestin<br>Shh est important pour permettre à l'ectoderme d'émerger |
| Chez l'adulte : | Si Wnt est trop actif, apparition de cancer colorectal<br>Si Shh est trop actif, médulloblastome et cancer de la peau |

## Les cellules souches

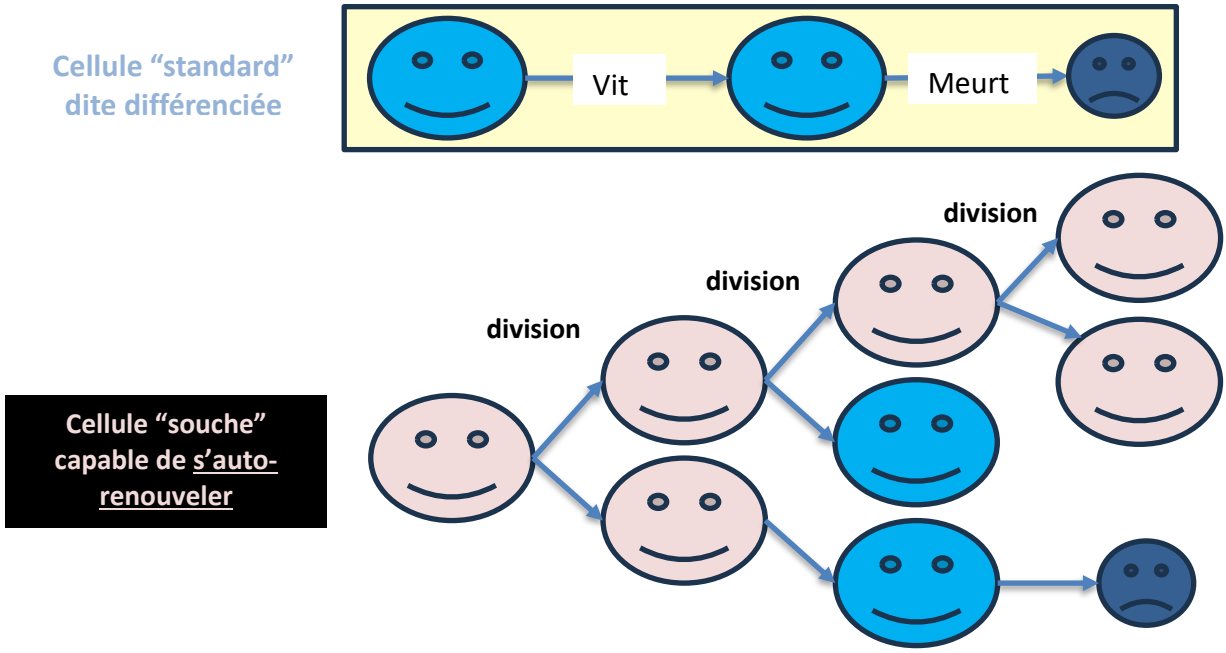
Je reviens sur ce processus de la gastrulation au cours duquel émergent les trois feuillets embryonnaires appelés ectoderme (peau et système nerveux), mésoderme (musculature, cœur, rein et squelette) et endoderme (viscères) - du grec ecto/extérieur, méso/milieu et endo/intérieur - suite au mouvement des cellules et à la signalisation. La nature et la durée de la signalisation va dicter le type d'organe qui va émerger.

Le schéma suivant illustre ce point. Une combinaison de quatre signaux inducteurs et de plusieurs antagonistes des mêmes signaux va dicter la nature des organes qui vont émerger de l'endoderme. Il n'est pas nécessaire de savoir exactement quels sont signaux, mais retenez que Wnt, qui va nous occuper par la suite, y joue un rôle central. Notez aussi que la présence de Wnt est essentielle pour permettre l'émergence de l'intestin grêle et du colon, mais pas du foie ou de l'estomac. En l'occurrence cet ensemble d'évènements de signalisation va avant tout aboutir à mettre de côté et définir l'identité d'une petite population de cellules, dites **cellules souches** qui elles vont donner naissance aux organes en question.




Les cellules souches se distinguent des cellules « standard », dont la destinée est de vivre un temps pour remplir leur fonction puis mourir, par le fait qu'elles peuvent se renouveler pratiquement indéfiniment. Ces cellules sont donc non seulement à l'origine des organes, mais aussi permettent aux organes de « se réparer » au cours de la vie. Par exemple, lorsque vous

vous faites une petite déchirure musculaire, celle-ci sera réparée grâce aux cellules souches musculaires qui sont appelées cellules satellites car elles sont localisées tout le long des muscles (plutôt qu'intégrées au muscle). Compte tenu de leur potentiel, il est essentiel que leur division soit étroitement contrôlée, sans quoi une excroissance puis une tumeur va apparaître. Ce processus est au cœur du cancer.



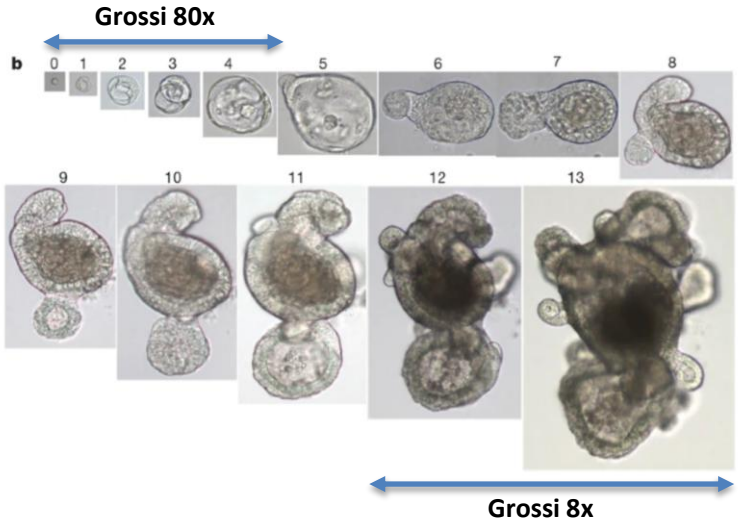

Par ailleurs, les biologistes ont récemment montré que n'importe quelle cellule peut être « reprogrammée » pour redevenir une cellule au potentiel de division infinie si on leur ajoute un cocktail de trois facteurs de transcription. Ceci tient au fait que pendant le développement un certain nombre de facteurs maintiennent un grand nombre de gènes en position éteinte, comme je l'ai souligné. Le cocktail des trois facteurs de transcription que je mentionne vient contrecarrer l'action de ceux qui éteignent.

## Les organoïdes et leur utilisation en médecine

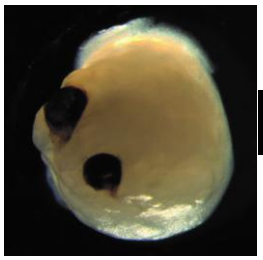
Un des chercheurs qui travaillait sur l'intestin afin de comprendre quels sont les mécanismes contrôlant son émergence, le néerlandais Hans Clevers, a pu identifier une petite population de cellules exprimant un **récepteur de Wnt**, et montré que celles-ci correspondent aux cellules souches de l'intestin. En utilisant la technique de marquage avec la protéine fluorescente de la méduse il a pu visualiser ces cellules chez l'animal. L'animation que vous allez voir, que j'ai récupérée d'une conférence qu'il a donnée, résume ses travaux tout en expliquant d'une part quelle est la structure de l'intestin, et d'autre part quelle est l'origine des cancers colorectaux.

Son équipe a pu isoler ces cellules souches intestinales grâce au marquage fluorescent et les mettre en culture au laboratoire en présence d'un cocktail de signaux correspondant à ceux

normalement requis pendant le développement embryonnaire pour permettre la formation de l'intestin. Ainsi il a remarqué que ces cellules prolifèrent et forment un mini-intestin avec cavité, qui a été nommé **organoïde**, bien que dépourvu des cellules immunitaires, musculaires et des vaisseaux sanguins que l'on trouve habituellement autour d'un intestin normal. Il a été le premier à produire des organoïdes.




Cette même procédure a maintenant été appliquée pour générer des organoïdes correspondant à presque tous les organes, en ajustant le cocktail de molécules de signalisation utilisé pour produire les organoïdes intestinaux. Peut-être les organoïdes les plus spectaculaires sont ceux dérivés de la glande vénéneuse des serpents à venin, en utilisant une procédure très proche de celle utilisée pour les organoïdes intestinaux, et ceux conduisant à la formation de mini-cerveaux. Dans ce dernier cas la procédure est très différente et dépend de cellules reprogrammées dont on induit la différenciation en tissu neural. L'intérêt de faire des organoïdes de glande vénéneuse est de pouvoir purifier des quantités importantes de venin sans avoir à attraper des serpents dangereux, de pouvoir préparer des sérums neutralisants plus facilement et de pouvoir en étudier leurs propriétés toxiques. L'intérêt des organoïdes cérébraux est de pouvoir étudier les processus normaux de transmission synaptique sans avoir à passer par l'animal, de pouvoir étudier certaines maladies qui affectent le système nerveux.

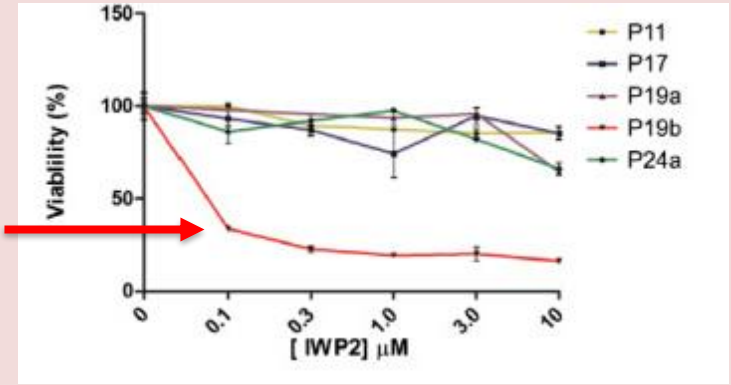


Mini-cerveau avec "yeux"

Pour en revenir aux organoïdes intestinaux, l'équipe de Hans Clevers a ensuite eu l'idée de les utiliser pour différencier les drogues efficaces contre certaines maladies de celles qui ne marchent pas. Il les a utilisés dans deux contextes. D'une part pour aider les médecins à soigner la mucoviscidose, et d'autre part dans le cadre des cancers colorectaux.

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente au sein de la population européenne (appelée aussi maladie du baiser salé). Cette maladie affecte une protéine qui pompe les ions chlorure (c'est une des deux moitiés du sel de cuisine, l'autre étant le sodium, le sel étant sur le plan chimique du chlorure de sodium) de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. Lorsque la protéine est défectueuse, le chlorure s'accumule à l'intérieur de la cellule, entraînant une plus grande viscosité du mucus secrété par les poumons et l'intestin, d'où en particulier les difficultés de respiration. Les porteurs hétérozygotes de la mucoviscidose semblent mieux résister au choléra, qui était fréquent au Moyen Age, car la toxine cholérique agit sur la protéine, ce qui explique sans doute sa haute incidence dans notre population (sélection positive). Il existe des drogues permettant de restaurer une fonction quasi normale à cette pompe à chlorure pour une moitié des 2000 variants de la maladie. Mais les drogues sont chères et peuvent avoir des effets secondaires, or on ne sait pas d'avance si elles seront efficaces. L'équipe de Clevers, en collaboration avec une des entreprises pharmaceutiques produisant ces drogues a produit des organoïdes intestinaux à partir des patients (en partant d'une petite biopsie rectale) et a testé au laboratoire si la drogue la plus efficace avait un effet sur « l'organoïde malade ». Il a ainsi pu constater que pour certains patients la drogue connue sous le nom d'Orkambi était très efficace, ce qui a conduit le système de santé néerlandais à homologuer le test et surtout à rembourser la drogue pour les patients répondant au test, ce qu'il refusait jusque-là.

Exemple de cinq mini-intestins issus de malades ayant un cancer colorectal soumis à un composé réputé anti-tumoral.
Seul un mini-intestin
a réagi (**courbe rouge**)




**Concentration drogue**

Enfin, une équipe japonaise ayant collaboré avec celle de Clevers a cherché à voir si des organoïdes intestinaux « sains » pourraient permettre de réparer les lésions intestinales chez des souris atteintes de l'équivalent chez l'homme de la maladie de Crohn ou de la rectocolite hémorragique. Les images du film semblent très prometteuses qui suggèrent un début de cicatrisation.

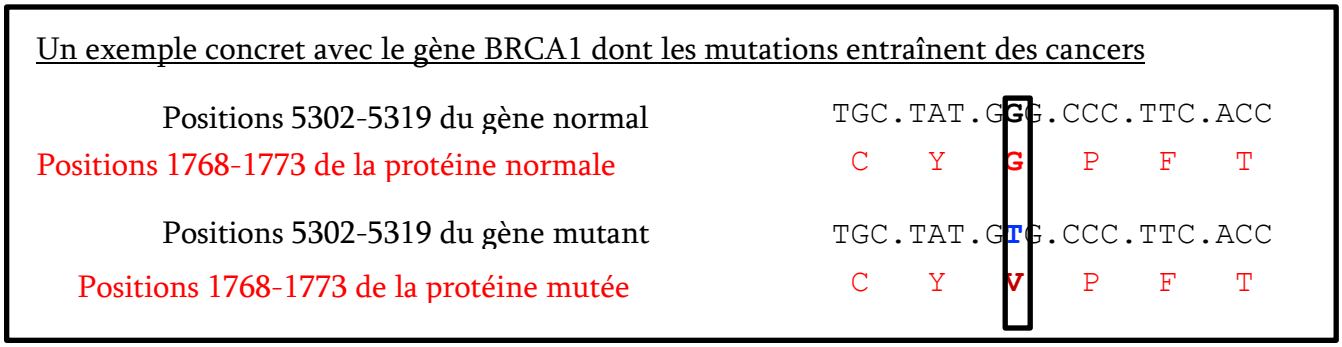
Je reviendrai sur ces avancées thérapeutiques à la toute fin pour mentionner les problèmes éthiques soulevés tant par les organoïdes en général que par leur utilisation en médecine.

## Autres aspects de la médecine personnalisée

Je voudrais maintenant élargir la question de la médecine personnalisée pour couvrir d'autres méthodes de plus en plus utilisées, en particulier dans le domaine de la cancérologie. L'objectif est toujours de choisir la drogue anti-cancéreuse la plus adaptée à une tumeur donnée pour un patient donné. Avec le recul et l'expérience on s'aperçoit que dans un nombre important de cas, un cancer est dû à l'apparition d'une mutation dans un gène particulier, auquel cas on peut connaître la drogue la plus efficace pour traiter ce cancer. Dans un nombre tout aussi important si ce n'est plus important de situations, la tumeur peut malheureusement survenir suite à plusieurs mutations ou réarrangements chromosomiques complexes, auquel cas il n'existe pas nécessairement de drogue idéale – c'est alors que le recours aux organoïdes peut s'avérer payant.

Je vais illustrer un cas en vous rappelant que nos chromosomes sont constitués d'ADN dont l'enchaînement précis de nucléotides diffère pour chaque gène. Par exemple prenons le gène appelé *Brca1*, dont les mutations entraînent un cancer du sein ou de l'utérus. Voici une petite portion de la séquence (enchaînement nucléotidique) de ce gène, et en dessous celle d'un variant commun chez les patientes atteintes d'un cancer lié à la perte de la protéine BRCA1. Sous chaque séquence d'ADN vous avez celle de la portion de protéine correspondante après traduction en suivant le **code génétique**. Le changement d'un seul nucléotide va provoquer un changement dans la protéine, où un petit acide aminé (G ou glycine) sera changé en gros acide aminé (V ou valine) provoquant une déformation de la protéine finale et son inactivation.

<u>Un exemple concret avec le gène BRCA1 dont les mutations entraînent des cancers</u>




Ce que les centres de cancérologie proposent de plus en plus maintenant est d'établir pour une tumeur donnée repose sur trois types de tests de séquence :

1- La séquence des gènes qui ont été répertoriées comme étant classiquement associés à la tumeur ; **Rapide (1-2 semaines) – coût 800-1500€ en général remboursé – échantillons peuvent être sales.**
2- Si la tumeur s'avère atypique, ils peuvent aussi proposer la séquence des 20.000 gènes du génome humain ; **Coût et rapidité intermédiaire (3-6 semaines) – 2000-4000€ pris en charge pour certaines pathologies – nécessite un échantillon de bonne qualité – résultats plus complexes.**
3- Dans les cas très spéciaux, il est aussi possible de proposer la séquence de tout le génome en y incluant les parties situées entre les gènes qui comme je l'ai souligné comportent les signaux on/off d'allumage des gènes ; **Long (4-8 semaines) – cher et peu**

**accessible (essais cliniques) – résultats très complexes – nécessite un gros échantillon de haute qualité.**

Chaque type de test présente des avantages et des inconvénients distincts, comme indiqué.

Dans le même esprit, on peut proposer la séquence des gènes qui jouent un rôle important dans le métabolisme des drogues. En effet lorsque vous avalez une drogue quelle qu'elle soit, cette drogue va pénétrer peu ou prou dans toutes les cellules, où elles seront modifiées chimiquement. Ces modifications peuvent générer un produit plus ou moins toxique. Par ailleurs le foie a une fonction centrale de détoxification des drogues. Différents types d'effets indésirables peuvent survenir, comme une élimination trop lente, l'atteinte d'un organe sensible, ou la reconnaissance anormale par le système immunitaire. La chimiothérapie peut exacerber ces effets indésirables si les protéines de transport, ou de détoxification sont altérées. On connaît un nombre important de protéines jouant ces rôles, et les tests de séquençage ciblés peuvent être proposés pour définir si une tumeur donnée a induit un changement dans l'une d'elles.

En France, presque tous les hôpitaux majeurs et les centres de lutte contre le cancer des grandes villes proposent les tests de génomique simples. Les tests par organoïdes ne sont pratiqués pour le moment que par un nombre plus restreint d'hôpitaux, les méthodes étant encore très récentes.

## Les problèmes éthiques liées aux progrès de la médecine personnalisée

Les organoïdes présentant de nombreux avantages, dont ceux de réduire les coûts, et les souffrances tant pour les patients qu'aussi pour les animaux. Mais ils présentent aussi des inconvénients. Tout d'abord il faut souligner qu'un organoïde n'est qu'une version très simplifiée d'un organe auquel il va manquer le système circulatoire et immunitaire. Les tests demeurent coûteux, et le risque d'une médecine à deux vitesses est posé. Leur devenir n'est pour le moment pas résolu, non plus que leur statut moral en particulier pour les organoïdes cérébraux. On peut avoir recours à des organoïdes animaux mais en ce cas se pose la question des xénogreffes.

S'agissant des méthodes de séquençage de tout ou partie du génome des patients, se pose aussi la question de la médecine à deux vitesses compte tenu des coûts non-négligeables de certaines analyses. Par ailleurs, la confidentialité des analyses est un point crucial, notre ADN étant peut-être l'élément le plus central et précieux de notre identité. Il est indispensable que ces données ne soient pas siphonnées par les compagnies d'assurance par exemple pour faire ensuite plus cher les primes pour soi ou sa famille, sans compter les aspects légaux en termes légaux (paternité, succession).

## Références utiles

**Les cellules souches** : un article de synthèse wikipedia https://fr.wikipedia.org/wiki/Cellule_souche; une introduction aux cellules souches plus tournée

vers leurs aspects médicaux https://www.irmb-inserm.fr/differenciation-cellulaire-totipotente-multipotente et https://www.irmb-inserm.fr/niche-cellules-souches-role-auto-renouvellement.

**Les organoïdes** : une introduction vulgarisée et claire https://lejournal.cnrs.fr/articles/les-organoides-de-mini-organes-aux-maxi-pouvoirs.

**Pour les organoïdes et les cellules souches intestinales** :je me suis appuyé sur le site de l'équipe de Hans Clevers, sur lequel vous trouverez trois conférences qu'il a données. C'est en anglais, mais en principe vous devriez pouvoir activer les sous-titres (lien vers les vidéos en bas de sa page d'équipe): https://www.hubrecht.eu/research-groups/clevers-group/. Une mini-synthèse qui commence à dater sur l'utilisation des organoïdes pour le traitement des patients atteints de mucoviscidose https://www.frequencemedicale.com/hepato-gastro-enterologie/actualites/7021-Mucoviscidose-les-organoides-rectaux-peuvent-ils-servir-au-diagnostic.

**Questions éthiques à propos des organoïdes** : une réflexion assez concise parmi d'autres au sujet des organoïdes https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2020/02/msc200030/msc200030.html.

Questions éthiques à propos du séquençage haut-débit : un article assez concis https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2024/04/msc230266/msc230266.html, et un dossier très complet sur les questions éthiques liées au séquençage haut débit https://www.ccne-ethique.fr/sites/default/files/2021-02/ccne_avis_124.pdf.