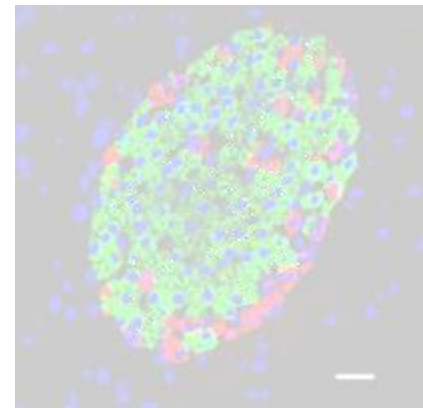
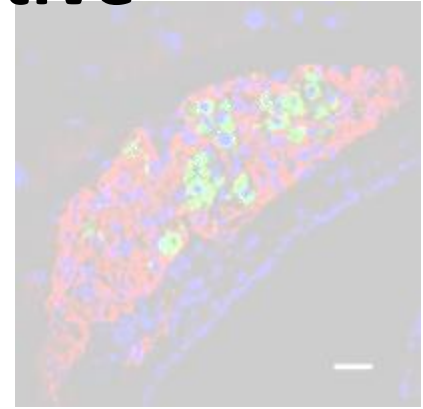
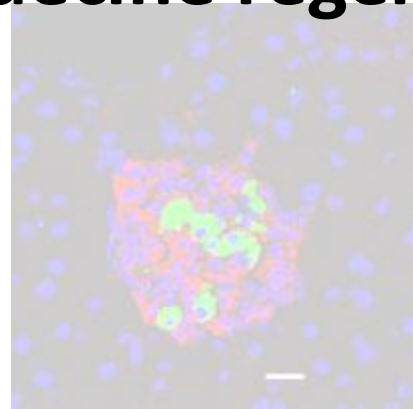


Utilisation des CELLULES SOUCHES
en recherche fondamentale
pour une **médecine régénérative**



...qu'est ce que la “médecine régénérative” ?



maladies dues
à une mort cellulaire inappropriée et massive :

1. déficiences immunitaires sévères
2. diabète
3. lésions de la moelle épinière
4. démyélinisation des nerfs
5. maladie de parkinson
6. infarctus du myocarde ...

« médecine régénérative »

...thérapie de remplacement
ou « rechange » des cellules manquantes...

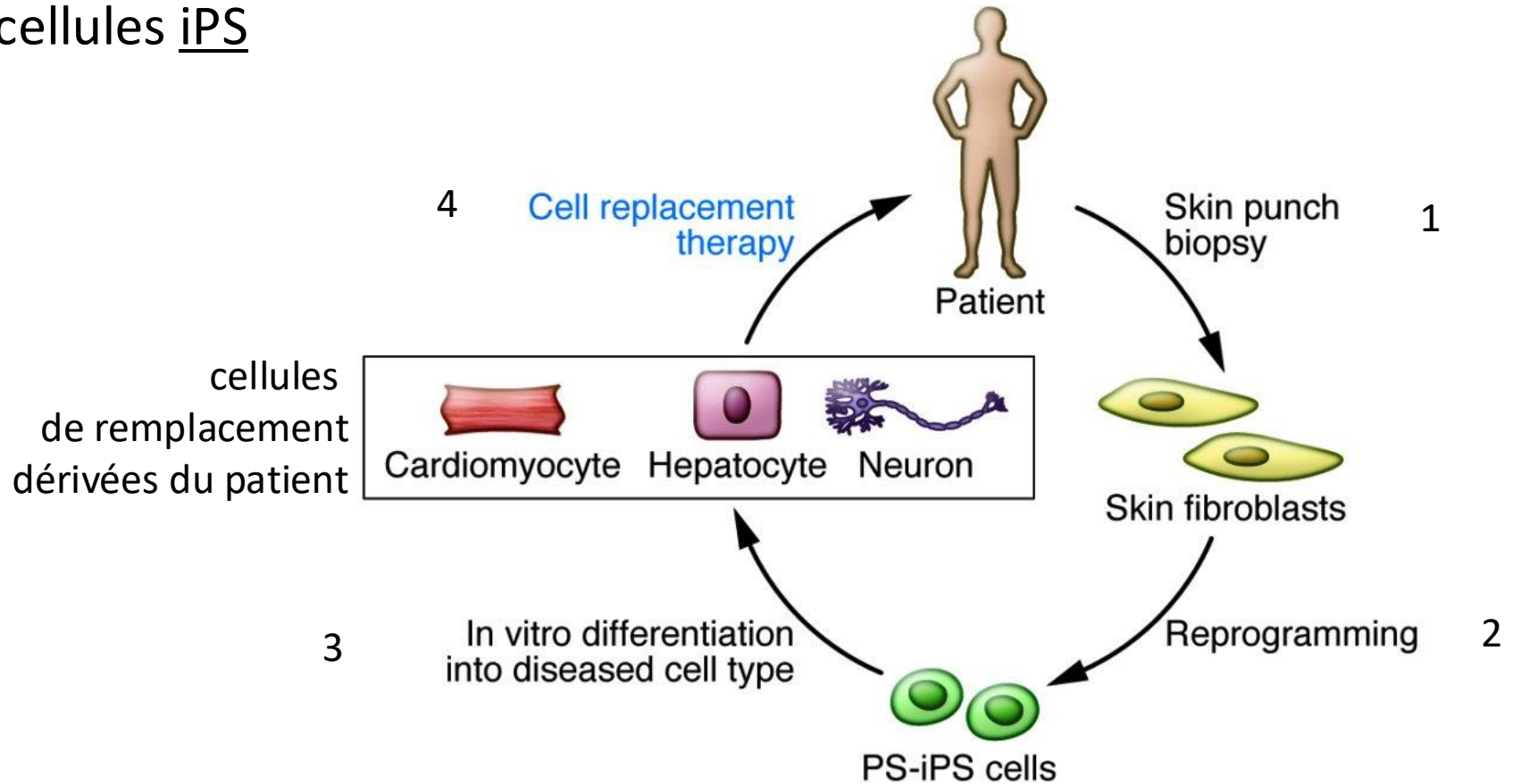
...produites à partir de « cellules souches »
ou « progénitrices »

... ou de cellules adultes *différenciées* !!!
(par « reprogrammation cellulaire »)

« THERAPIE CELLULAIRE »

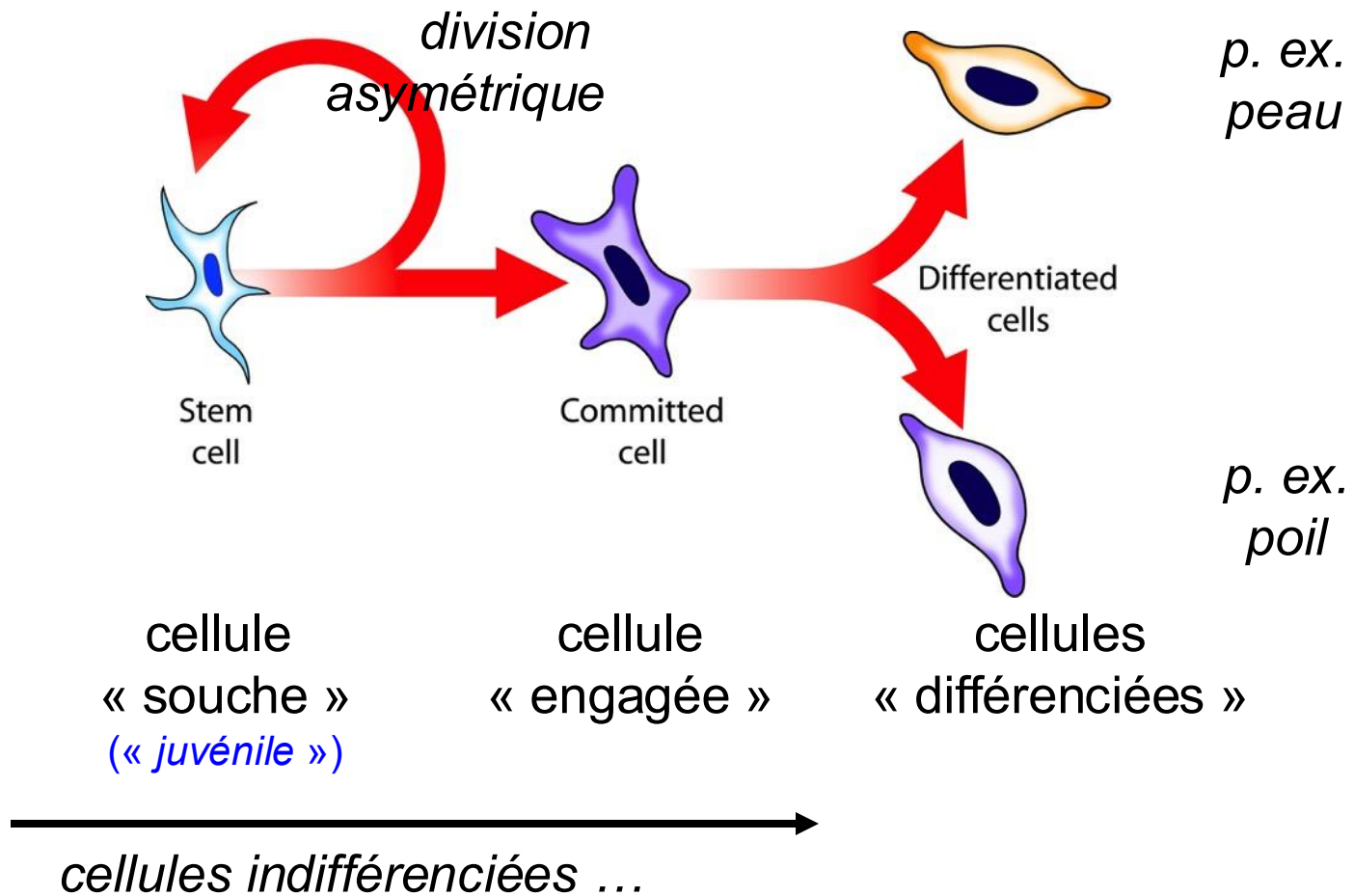
Médecine Régénérative: deux approches

- génération *ex vivo* de cellules de remplacement obtenues à partir de cellules souches dérivées du patient : moelle, cellules ES ou cellules iPS



- exploiter la capacité de régénération (intrinsèque) de l'organe

...C'est quoi une cellule souche ?



...y a-t-il des cellules souches chez l'adulte ?

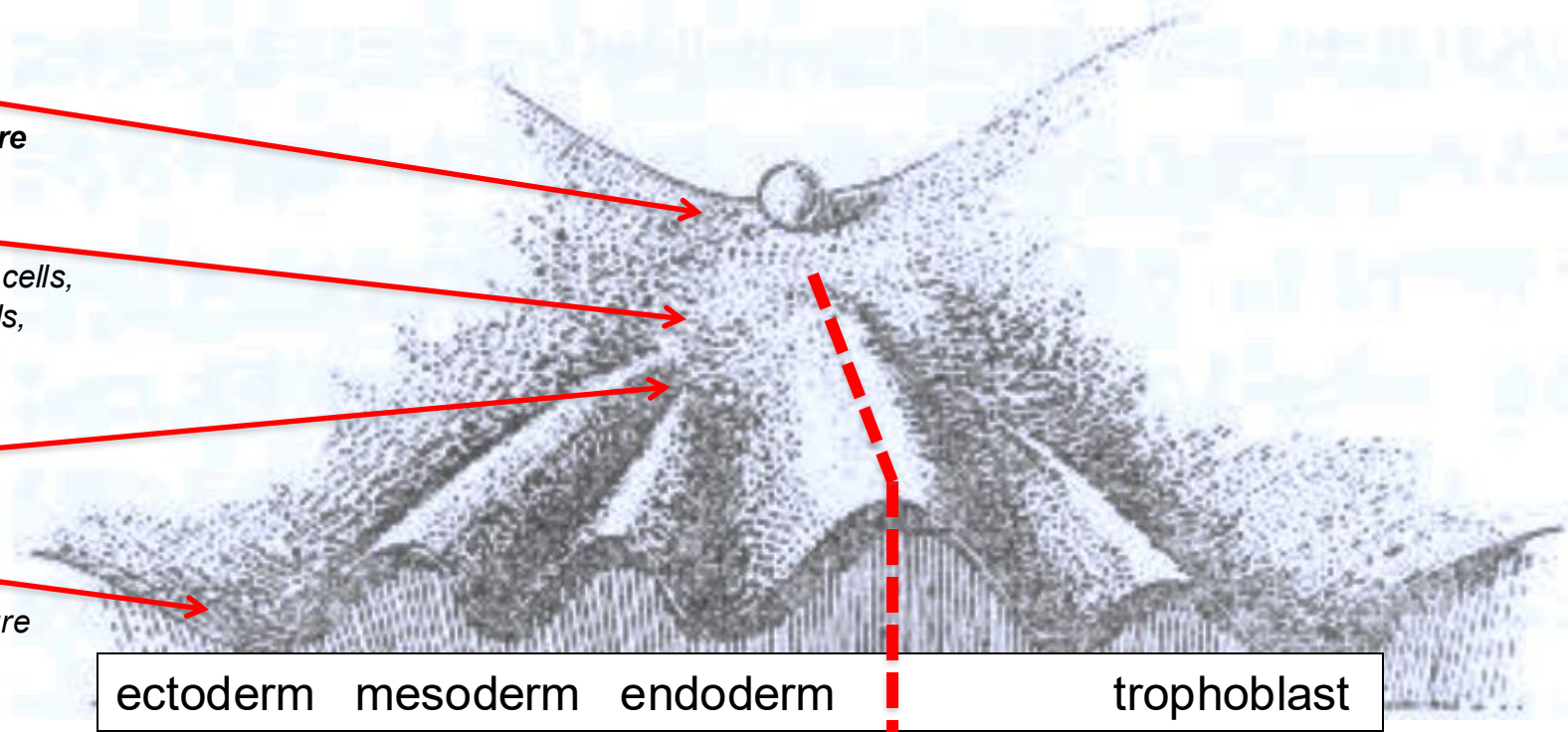
differentiation potential

totipotent
zygote, blastomere

pluripotent
ICM/ES cells, EG cells, EC cells, mGS cells, iPS cells

multipotent
adult stem cells

unipotent
differentiated mature cell types



Epigenetics and differentiation potential (cell fate) :

pluripotent

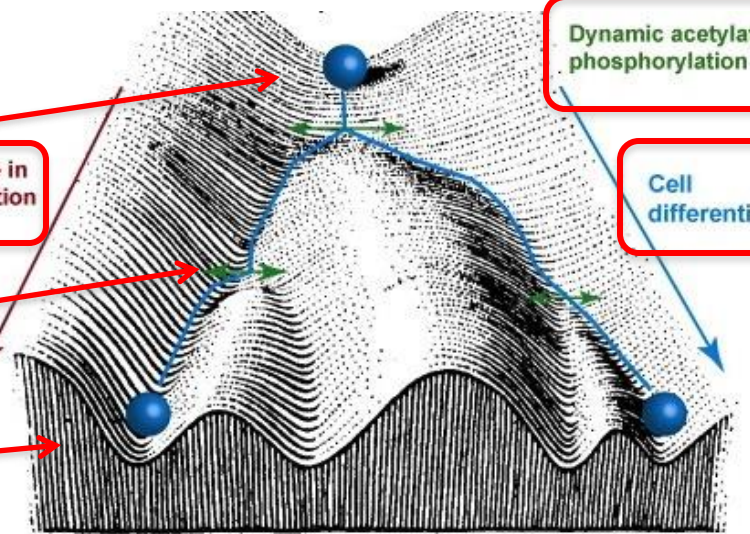
multipotent

unipotent

Increase in methylation

Dynamic acetylation/ phosphorylation

Cell differentiation

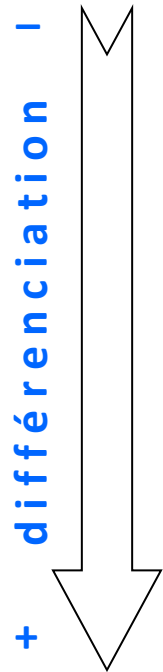


Cell state A Cell state B Cell state C Cell state D

le potentiel de différenciation cellulaire

cellule totipotente
(zygote, blastomère),
à potentiel illimité

cellule "juvénile",
indifférenciée



cellule
« **souche** »
(**pluripotente**)

spécification



cellule
« **progénitrice** »
(souvent appelée aussi
« cellule souche », par extension)
(**multipotente**)

détermination



cellule
« **précurseur** »
(**unipotente**)

différenciation



cellule "mature",
spécialisée

cellule
« **différenciée** »

cellule pluripotente

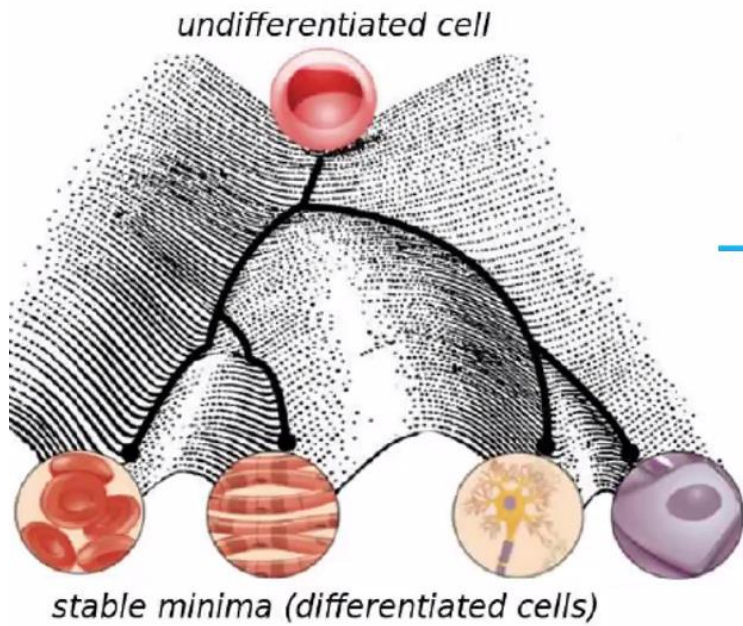
(*masse cellulaire interne, ES, iPS*),
peut donner tous les tissus
de l'organisme (ecto-, méso- et endoderme)

cellule multipotente

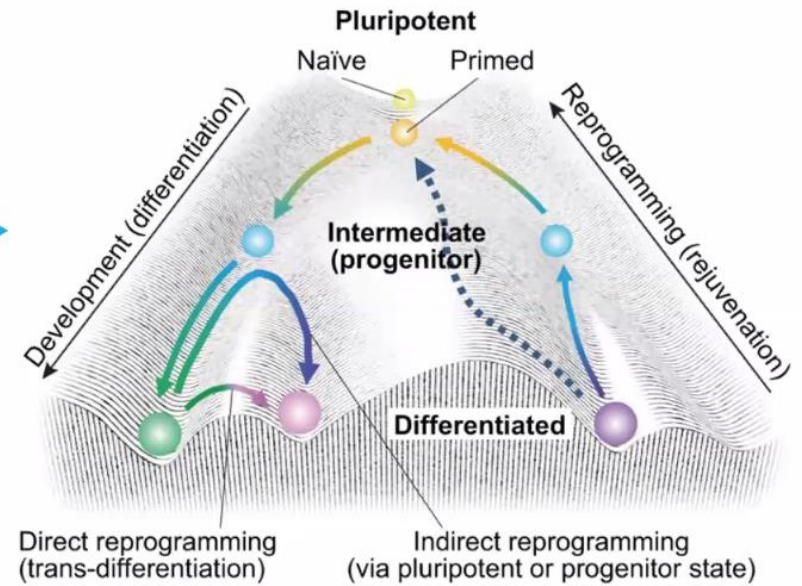
(*cellules souches « adultes »*),
peut donner tous les types cellulaires
d'un tissu (p. ex. : cellules souches du sang)

cellule unipotente

le potentiel de différenciation
est restreint : elle ne peut donner qu'un
seul type cellulaire mature



1950s View

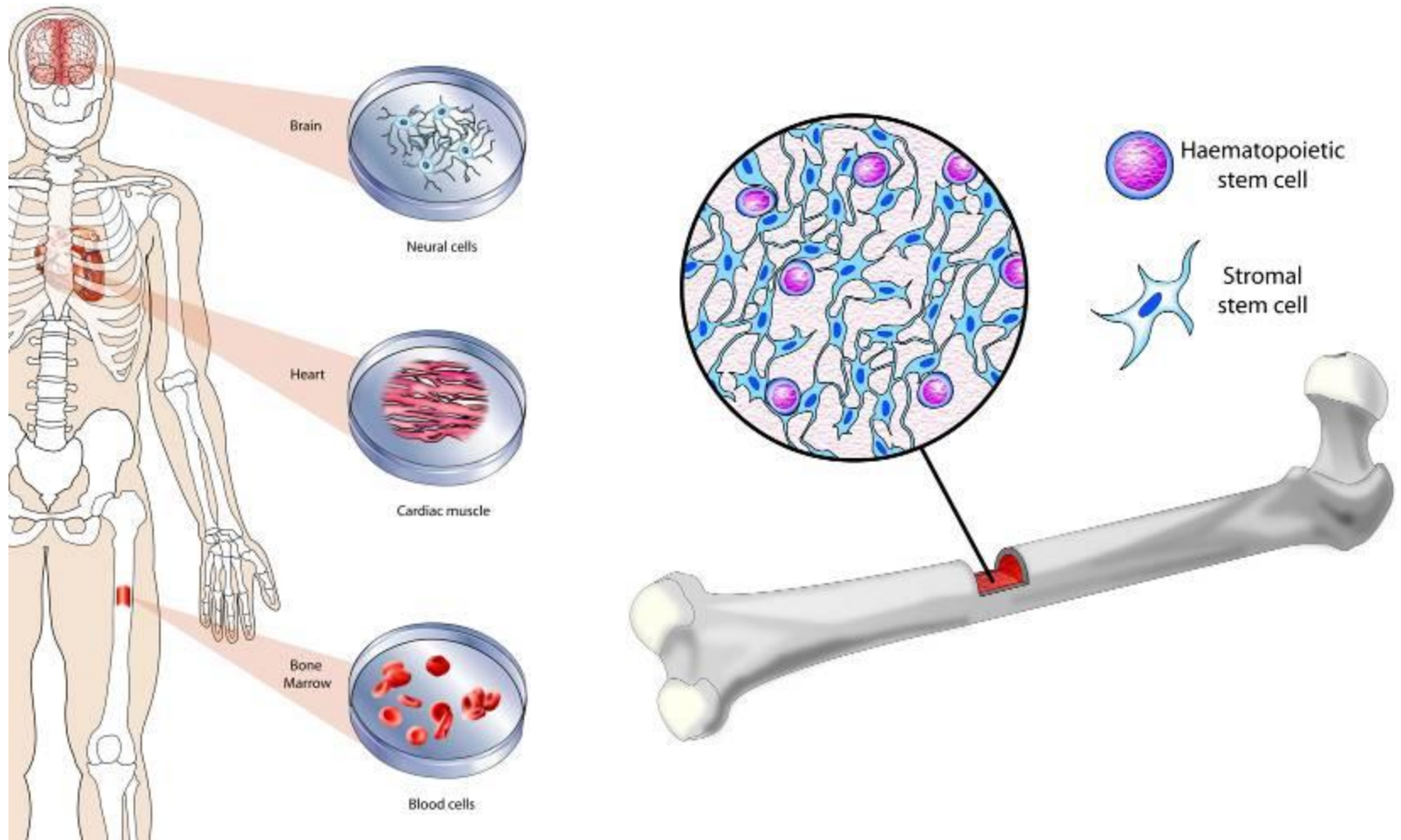


Modern View

Reprogrammation cellulaire :

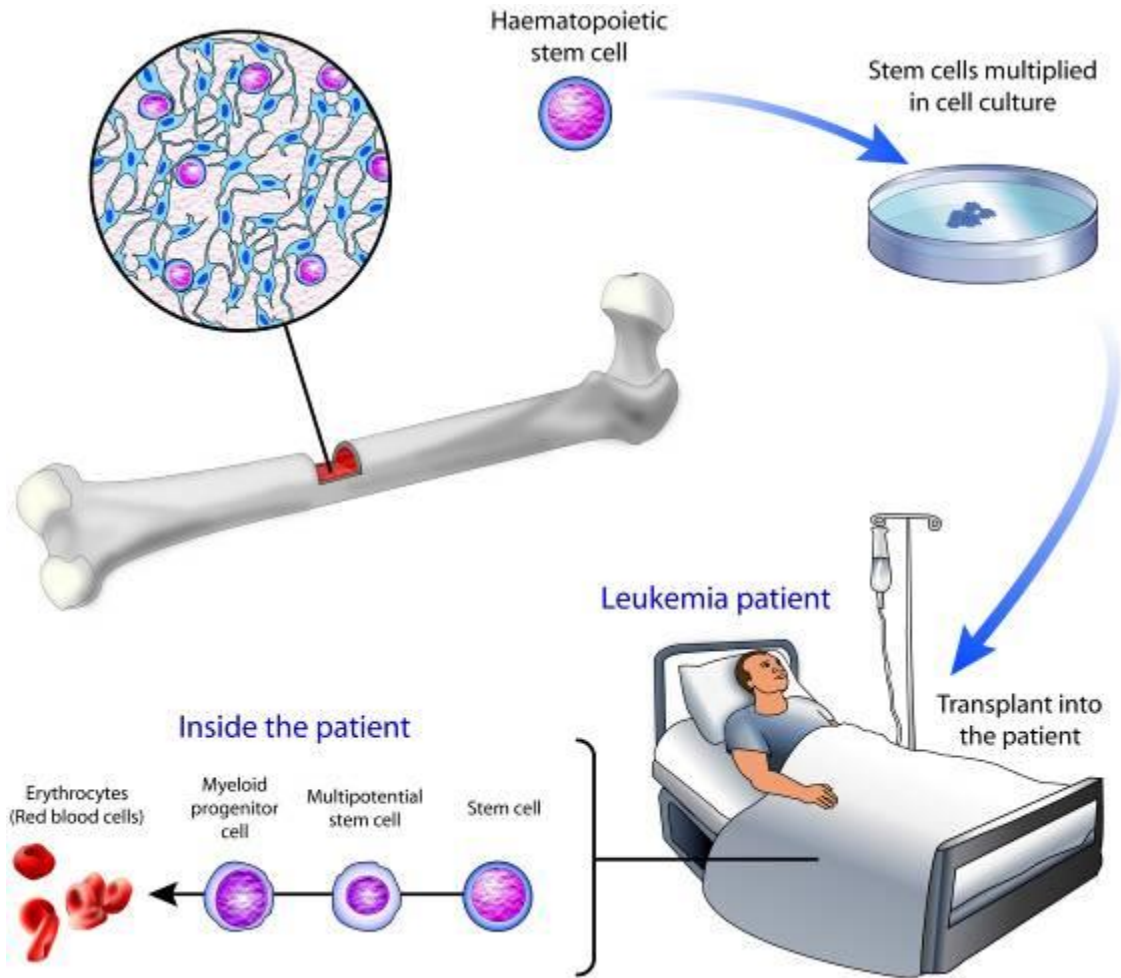
- directe ("transdifférenciation")
- indirecte (dédifférenciation et redifférenciation)

...y a-t-il des cellules souches « adultes » ?



...OUI: système de « réparation » du corps !

Traitement des leucémies...



...il y a des cellules souches aussi
dans le cordon ombilical et le placenta

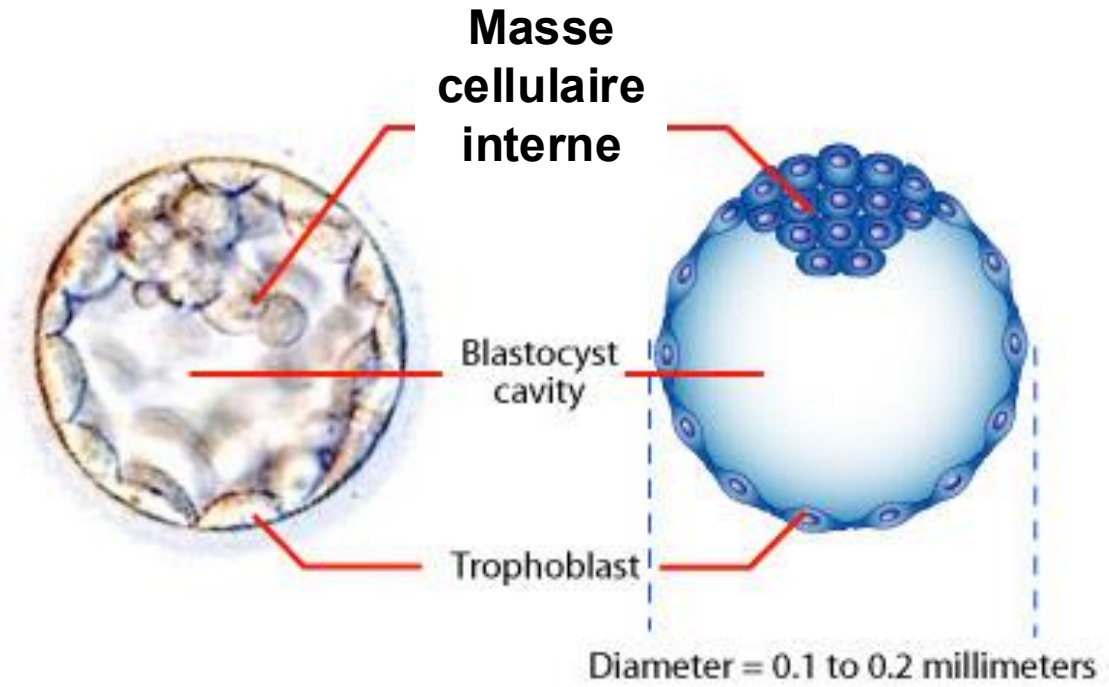


...potentiellement utiles pour traiter des maladies
génétiqes

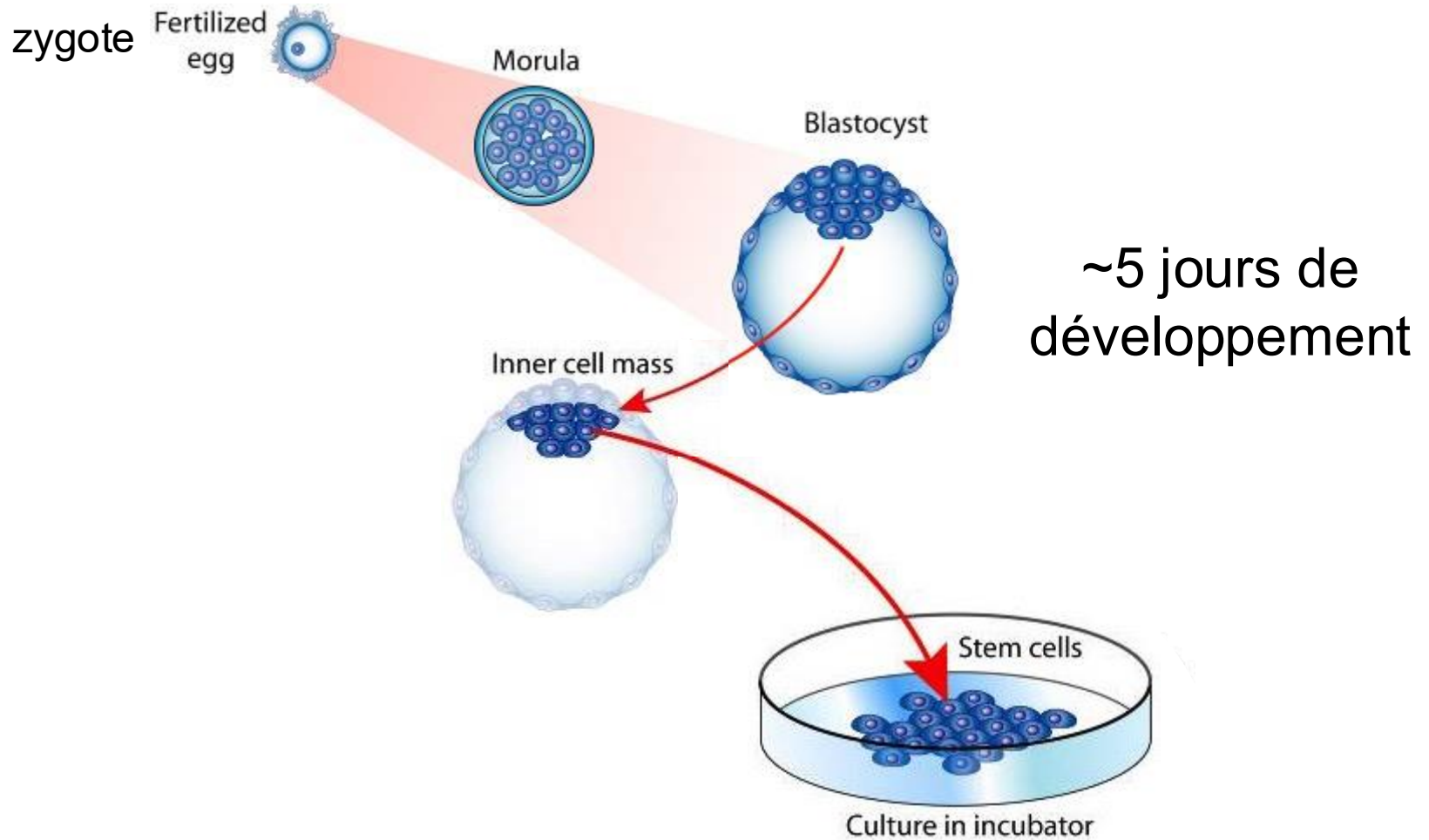
...et les cellules souches « embryonnaires »

zygote
(souris)

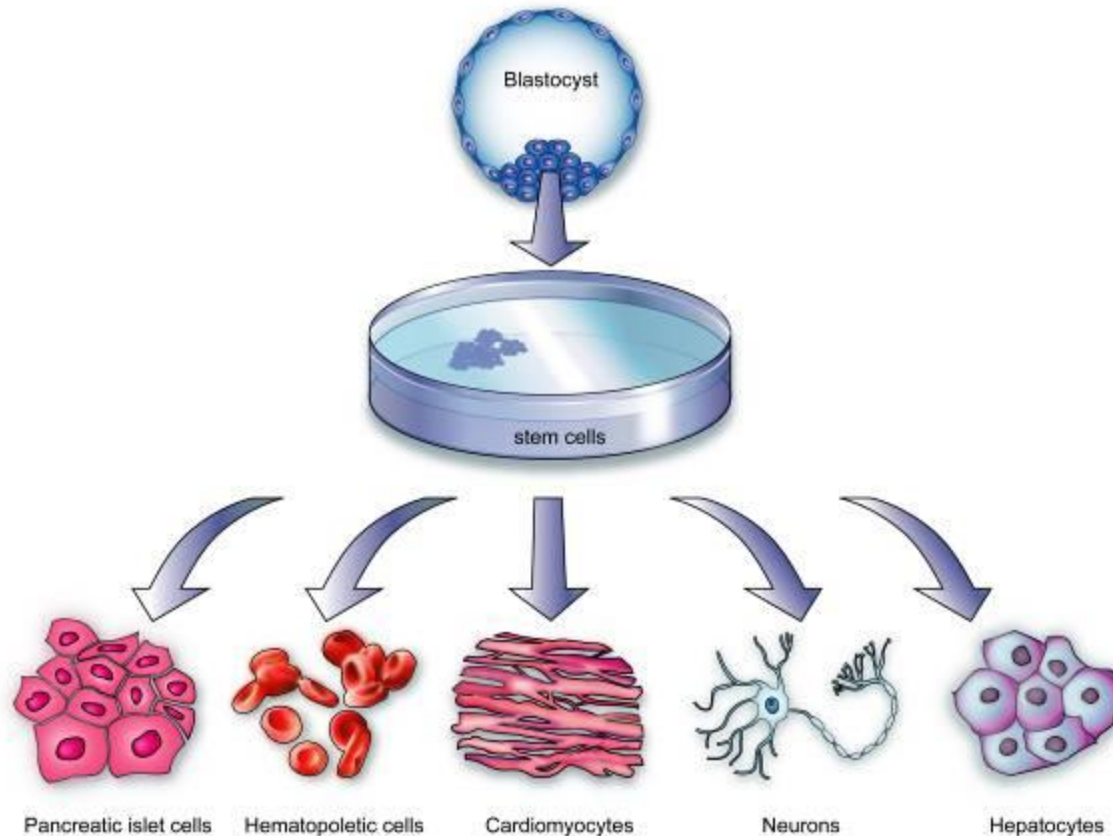




Obtention de cellules souches « embryonnaires » (ES cells)



Les cellules souches « embryonnaires » (« cellules ES »)
sont PLURIPOTENTES



...mais on commence seulement à maîtriser la façon de diriger
in vitro la différenciation des cellules souches...

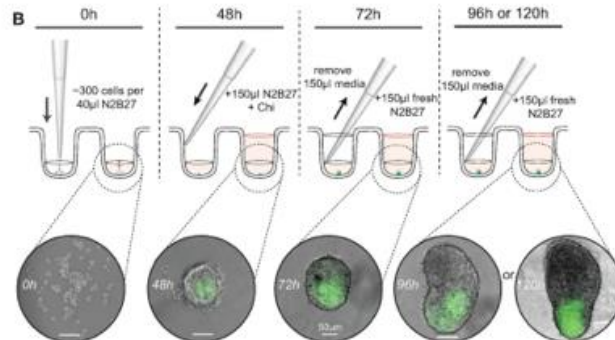
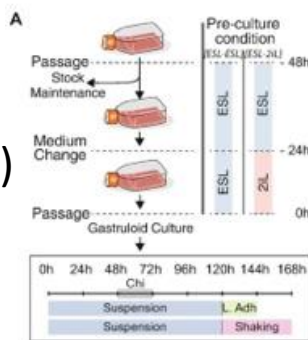
organoïdes, embryoides et gastruloïdes

Un **organoïde** est une version miniature et simplifiée d'un organe, fabriquée *in vitro* avec une "micro-anatomie".

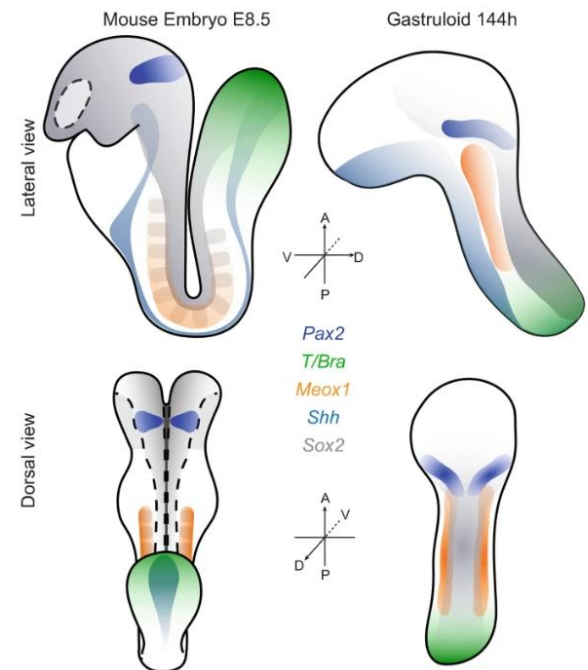
Un **embryoïde** est ainsi une version d'un embryon précoce ("blastoïde"), et un **gastruloïde** est un modèle *in vitro* d'un embryon pendant la gastrulation.

Ils sont issus de *cellules souches embryonnaires* (ESc) ou de *cellules souches pluripotentes induites* (iPSC), ou autres cellules souches tissulaires, qui peuvent s'auto-organiser en structures tridimensionnelles grâce à leurs capacités d'auto-renouvellement et de différenciation.

(gastruloïdes)



(organoïde intestinal)



vers une thérapie cellulaire du diabète

actuellement : transplantation d'îlots pancréatiques

en recherche biomédicale :

utilisation des cellules souches embryonnaires (“cellules ES”)

et surtout

des cellules souches pluripotentes induites (“cellules iPS”)

diabète :

polyurie associée à polydipsie

diabetes insipidus

défaut en ADH (vasopressine) :

*mauvaise réabsorption
de l'eau dans les reins*

type II

déficiences relative d'insuline
(épuisement de production) :

"résistance à l'insuline"; obésité

*diabète gestationnel (grossesse) :
fœtus de grande taille*

Avec une composante génétique :

***MODY** (diabètes monogéniques)*

***NEONATAL** (sécrétion d'insuline inhibée)*

diabetes mellitus

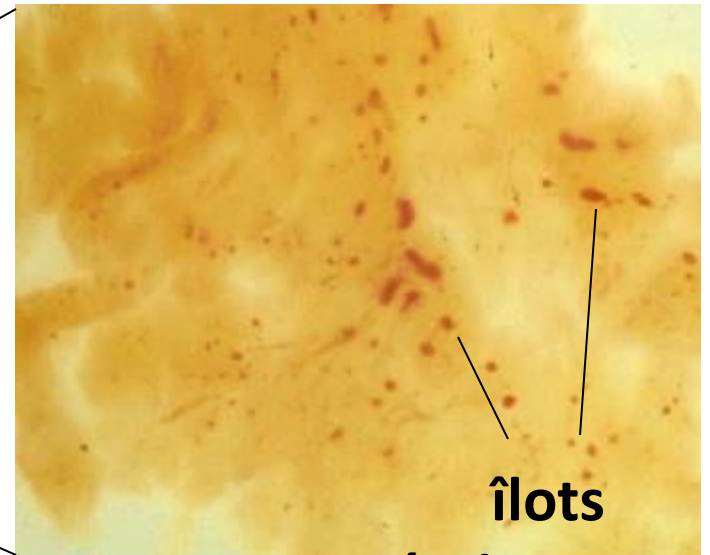
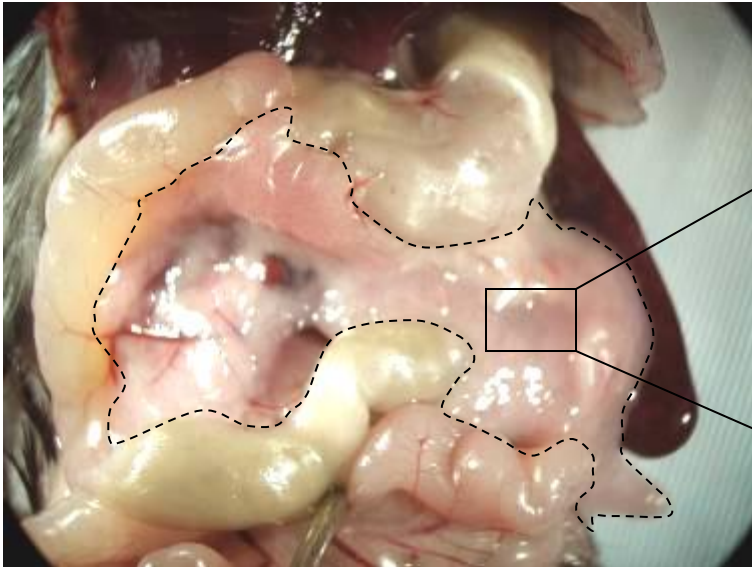
hyperglycémie; glycosurie

type I,
juvénile

manque absolu d'insuline :

*destruction des cellules
productrices d'insuline
(par le système immunitaire)*

Pancréas *murin* (= de souris)

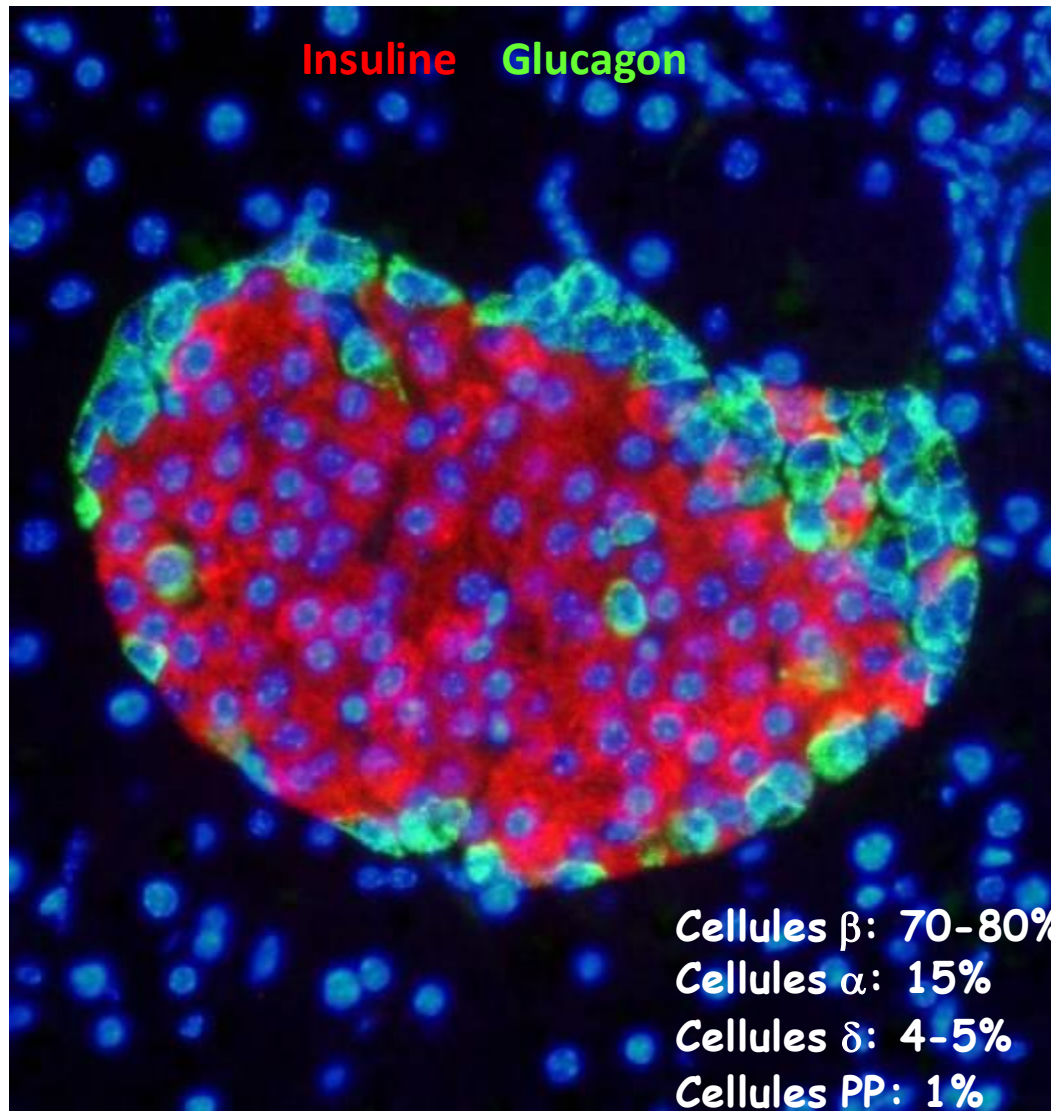


îlots
pancréatiques

Exocrine: 99%

Endocrine (îlots): 1%

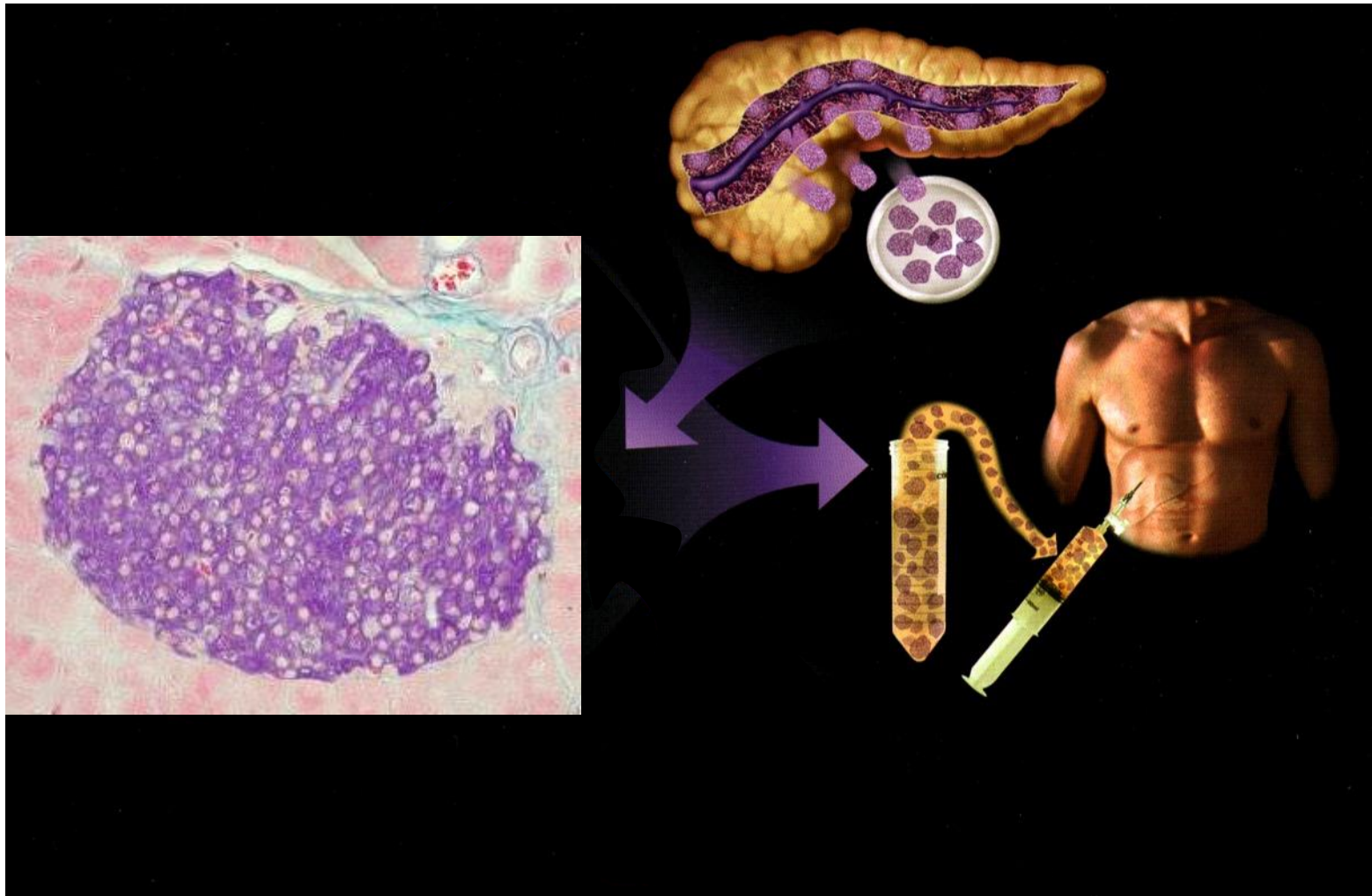
Ilot de Langerhans (= îlot pancréatique) (souris)



... Vers une thérapie cellulaire
pour traiter le diabète ?

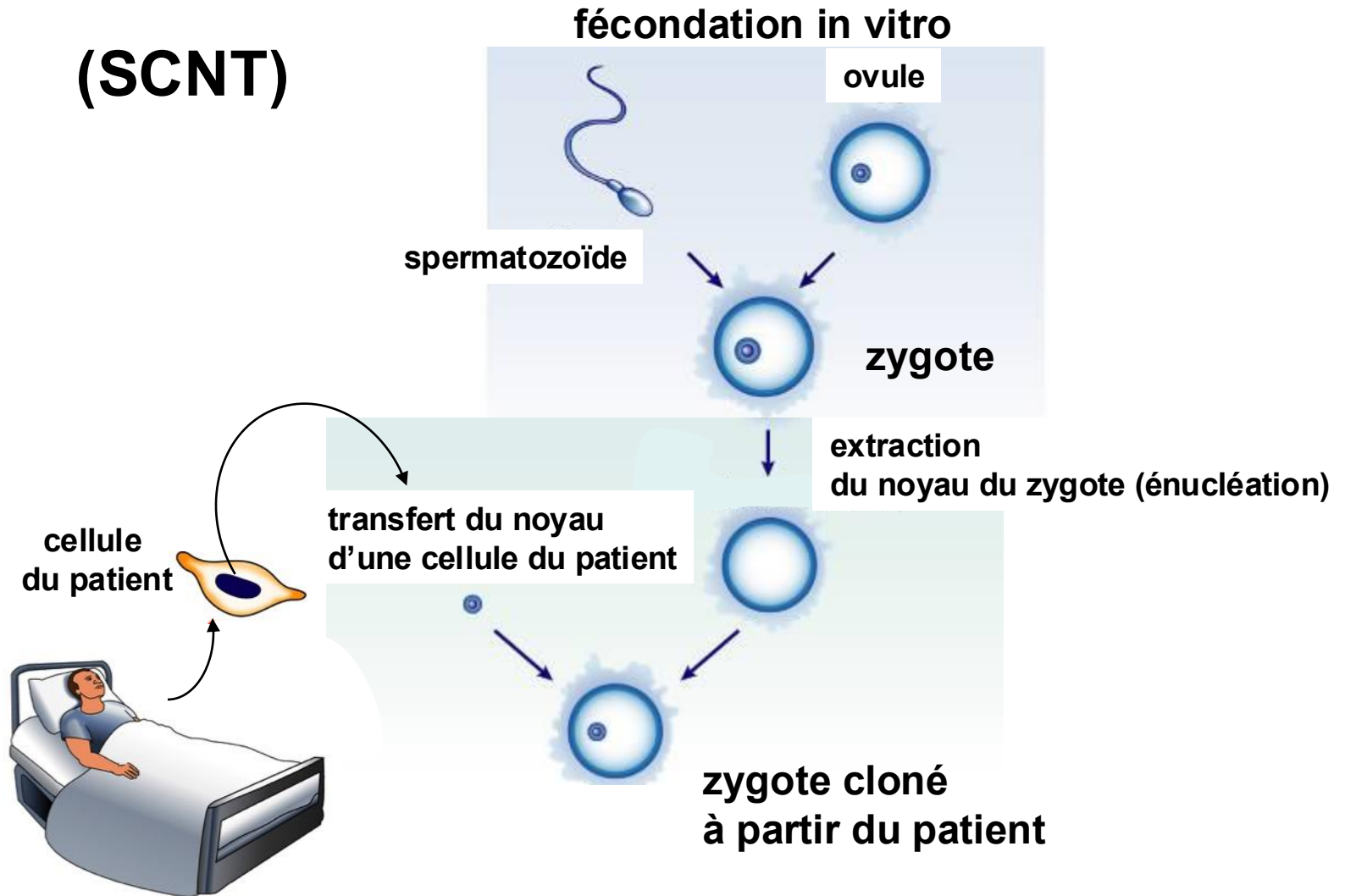
thérapie cellulaire : “protocole Edmonton”

(transplantation d' îlots pancréatiques ...dans le foie!)



« CLONAGE THÉRAPEUTIQUE » par transfert de noyau d'une cellule du corps du patient...

(SCNT)



NEWS IN FOCUS

FUNDING German researchers expect more funding under new government **p.388**

METRICS China moves into first place in production of scientific articles **p.390**

ANTHROPOLOGY Questions emerge about oldest known hominin **p.391**



BOTANY Classical plant morphology is poised for a renaissance **p.396**

QIANG SUN/MI-MING POCOCKS



A baby long-tailed macaque, named Zhong Zhong, is one of the first cloned monkeys.

GENETICS

Monkeys cloned in China

Genetically identical animals promise improved models of human disease, but raise concerns about reproductive cloning of humans.

BY DAVID CYRANOSKI

Biologists in Shanghai, China, have created the first primates cloned with a technique similar to the one used to clone Dolly the sheep and nearly two dozen other species. The method has failed to produce live primates until now.

Researchers hope to use this revised technique to develop populations of genetically identical primates to provide improved animal models of human disorders, such as cancer. The technology, described in *Cell* on 24 January (Z. Liu *et al. Cell* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.020>; 2018), could

also be combined with gene-editing tools such as CRISPR-Cas9 to create genetically engineered primate-brain models of human disorders, including Parkinson's disease.

"This paper really marks the beginning of a new era for biomedical research," says Xiong Zhi-Qi, a neuroscientist who studies brain disease at the Chinese Academy of Sciences Institute of Neuroscience (ION) in Shanghai. He was not involved in the cloning project.

But the achievement is also likely to raise some concerns among scientists and the public that the technique might be used to create cloned humans. "Technically, there is no barrier to human cloning," says ION director

Mu-Ming Poo, who is a co-author of the study. But ION is interested only in making cloned non-human primates for research groups, says Poo: "We want to produce genetically identical monkeys. That is our only purpose."

Primates have proved tricky to copy, despite many attempts using the standard cloning technique. In that method, the DNA of a donor cell is injected into an egg that has had its own genetic material removed.

ION researchers Sun Qiang and Liu Zhen combined several techniques developed by other groups to optimize the procedure. One trick was to undo chemical modifications in the DNA that occur when embryonic cells turn ▶

(2018)

(2013)

Please cite this article in press as: Tachibana et al., Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer, Cell (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.006>

Cell

Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer

Masahito Tachibana,¹ Paula Amato,² Michelle Sparman,¹ Nuria Marti Gutierrez,¹ Rebecca Tippner-Hedges,¹ Hong Ma,¹ Eunju Kang,¹ Alimujiang Fulati,¹ Hyo-Sang Lee,^{1,6} Hathaitip Sritanaudomchai,³ Keith Masterson,² Janine Larson,² Deborah Eaton,² Karen Sadler-Fredd,² David Battaglia,² David Lee,² Diana Wu,² Jeffrey Jensen,^{1,4} Phillip Patton,² Sumita Gokhale,⁵ Richard L. Stouffer,^{1,2} Don Wolf,¹ and Shoukhrat Mitalipov^{1,2,*}

¹Division of Reproductive & Developmental Sciences, Oregon National Primate Research Center, Oregon Health & Science University, 505 NW 185th Avenue, Beaverton, OR 97006, USA

²Division of Reproductive Endocrinology, Department of Obstetrics and Gynecology, Oregon Health & Science University, 3181 SW Sam Jackson Park Road, Portland, OR 97239, USA

³Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

⁴Women's Health Research Unit, Oregon Health & Science University, 3303 SW Bond Avenue, Portland, OR 97239, USA

⁵Boston University School of Medicine, 72 East Concord Street, Boston, MA 02118, USA

⁶Present address: Laboratory Animal Center, Osong Medical Innovation Foundation, Chungbuk 363-951, Republic of Korea

*Correspondence: mitalipo@ohsu.edu

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.006>

SUMMARY

Reprogramming somatic cells into pluripotent embryonic stem cells (ESCs) by somatic cell nuclear transfer (SCNT) has been envisioned as an approach for generating patient-matched nuclear transfer (NT)-ESCs for studies of disease mechanisms and for developing specific therapies. Past attempts to produce human NT-ESCs have failed secondary to early embryonic arrest of SCNT embryos. Here, we identified premature exit from meiosis in human oocytes

cloning, the nature of reprogramming oocyte factors and their mechanism of action remain largely unknown.

In humans, SCNT was envisioned as a means of generating personalized embryonic stem cells from patients' somatic cells, which could be used to study disease mechanisms and ultimately for cell-based therapies (Lanza et al., 1999; Yang et al., 2007). However, the derivation of human nuclear transfer-embryonic stem cells (NT-ESCs) has not been achieved despite numerous attempts during the past decade. The roadblock responsible for failure is early embryonic arrest of human SCNT embryos precluding derivation of stable NT-ESCs. Typi-

(2011)

LETTER

doi:10.1038/nature13287

Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells

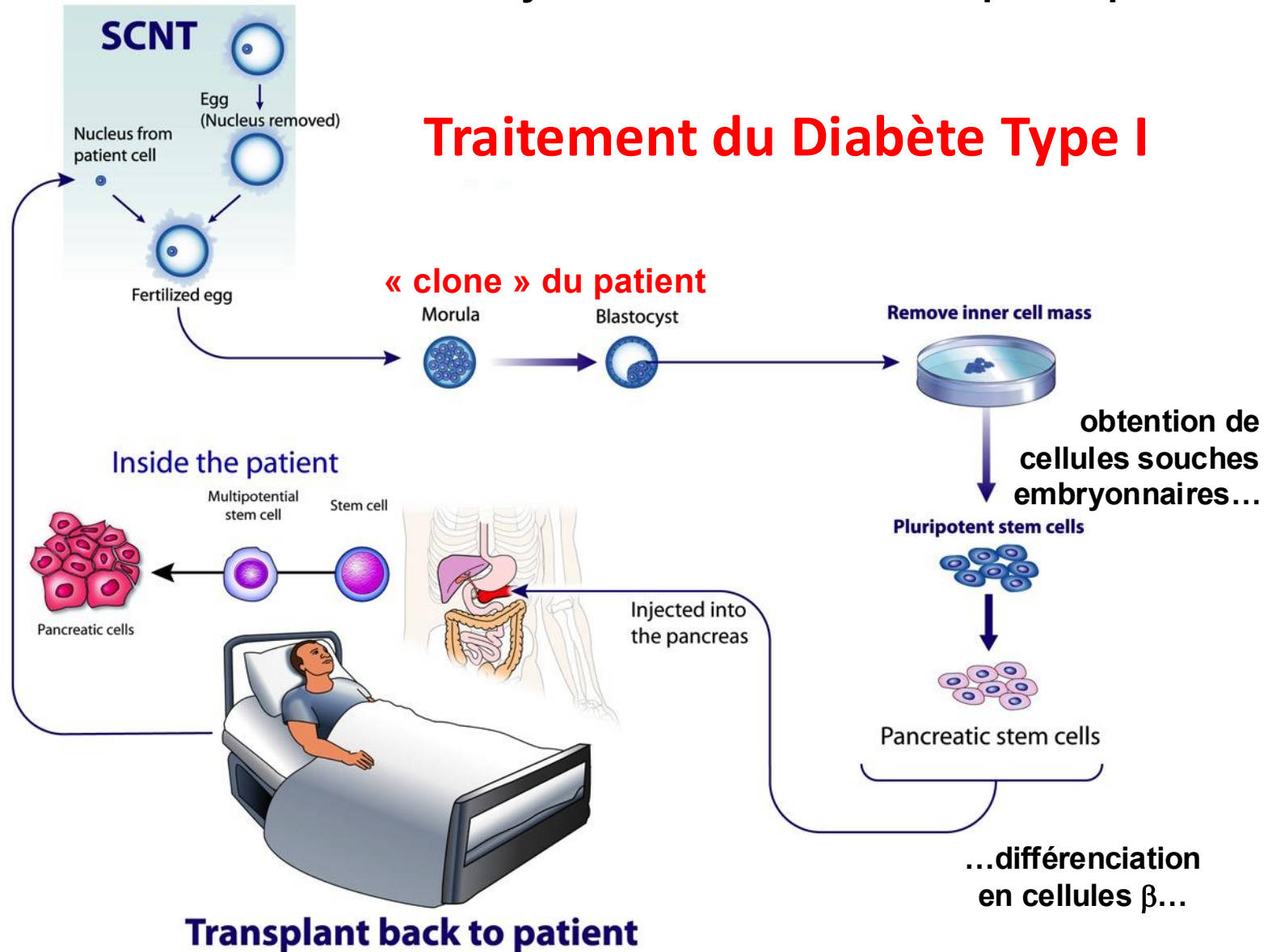
Mitsutoshi Yamada^{1*}, Bjarki Johannesson^{1*}, Ido Sagi², Lisa Cole Burnett³, Daniel H. Kort^{4,5}, Robert W. Prosser^{4,5}, Daniel Paull¹, Michael W. Nestor¹, Matthew Freeby³, Ellen Greenberg³, Robin S. Goland³, Rudolph L. Leibel³, Susan L. Solomon¹, Nissim Benvenisty², Mark V. Sauer^{4,5} & Dieter Egli¹

production de cellules hES à partir d'un patient diabétique

(technique de clonage thérapeutique)

En théorie...

SCNT = transfert du noyau d'une cellule somatique du patient



Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro

(2014)

Felicia W. Pagliuca,^{1,3} Jeffrey R. Millman,^{1,3} Mads Gürtler,^{1,3} Michael Segel,¹ Alana Van Dervort,¹ Jennifer Hyoje Ryu,¹ Quinn P. Peterson,¹ Dale Greiner,² and Douglas A. Melton^{1,*}

¹Department of Stem Cell and Regenerative Biology, Harvard Stem Cell Institute, Harvard University, 7 Divinity Avenue, Cambridge, MA 02138, USA

²Diabetes Center of Excellence, University of Massachusetts Medical School, 368 Plantation Street, AS7-2051, Worcester, MA 01605, USA

³Co-first author

*Correspondence: dmelton@harvard.edu

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.040>

nature
biotechnology

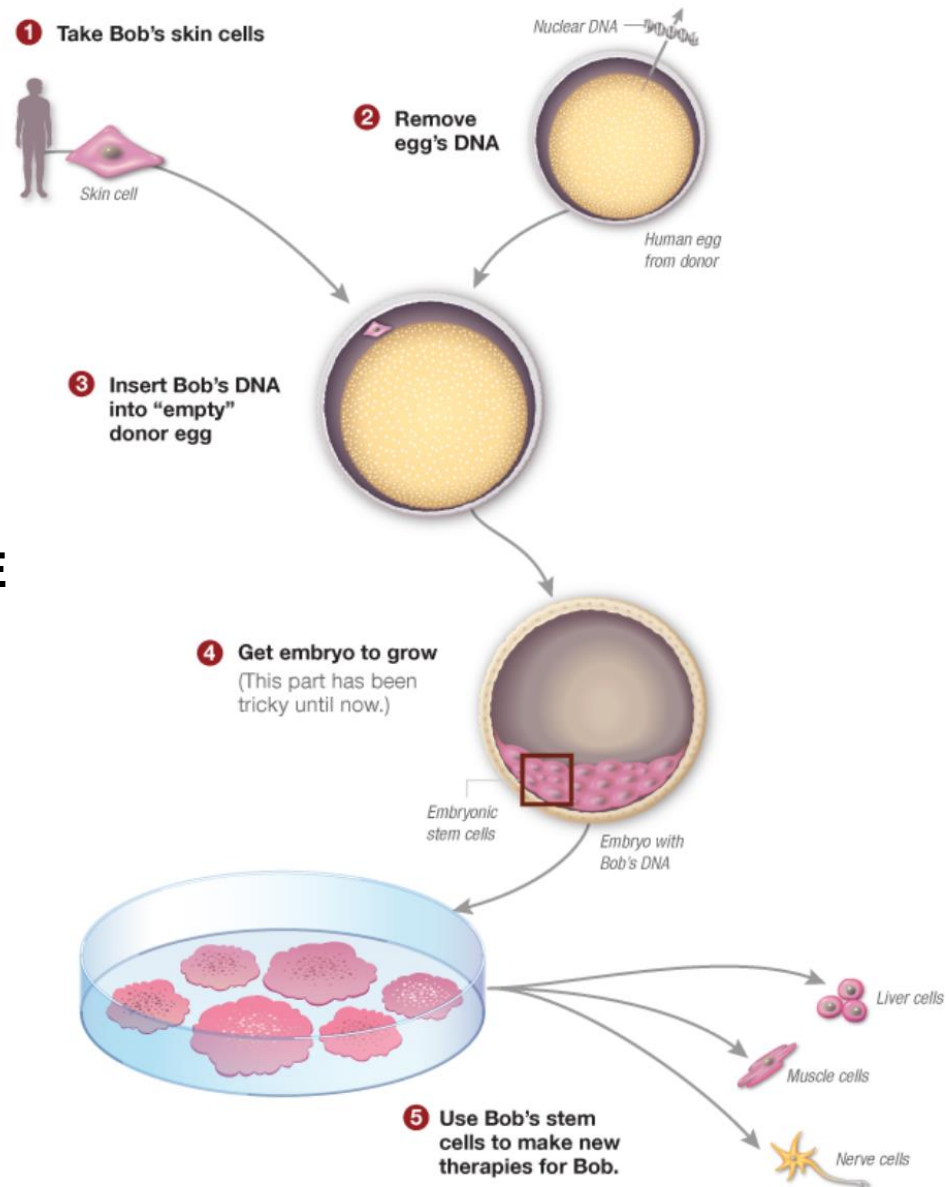
Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived *in vitro* from human pluripotent stem cells

Alireza Rezaia¹, Jennifer E Bruin², Payal Arora¹, Allison Rubin¹, Irina Batushansky¹, Ali Asadi², Shannon O'Dwyer², Nina Quiskamp², Majid Mojibian², Tobias Albrecht², Yu Hsuan Carol Yang², James D Johnson^{2,3} & Timothy J Kieffer^{2,3}

Transplantation of pancreatic progenitors or insulin-secreting cells derived from human embryonic stem cells (hESCs) has been proposed as a therapy for diabetes. We describe a seven-stage protocol that efficiently converts hESCs into insulin-producing cells. Stage (S) 7 cells expressed key markers of mature pancreatic beta cells, including MAFA, and displayed glucose-stimulated insulin secretion similar to that of human islets during static incubations *in vitro*. Additional characterization using single-cell imaging and dynamic glucose stimulation assays revealed similarities but also notable differences between S7 insulin-secreting cells and primary human beta cells. Nevertheless, S7 cells rapidly reversed diabetes in mice within 40 days, roughly four times faster than pancreatic progenitors. Therefore, although S7 cells are not fully equivalent to mature beta cells, their capacity for glucose-responsive insulin secretion and rapid reversal of diabetes *in vivo* makes them a promising alternative to pancreatic progenitor cells or cadaveric islets for the treatment of diabetes.

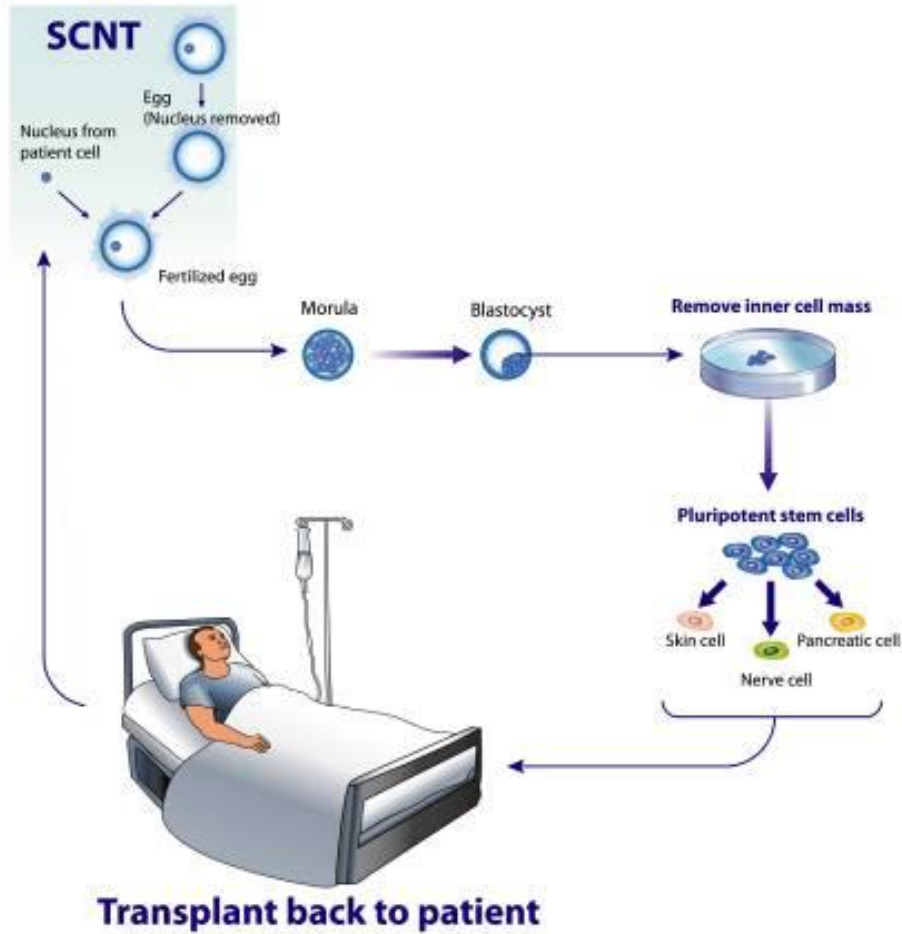
Making Personalized Stem Cells

Scientists report Wednesday that they have successfully cloned human embryos from a person's skin cells. Here's how they could eventually use the technology to create new therapies for a patient.

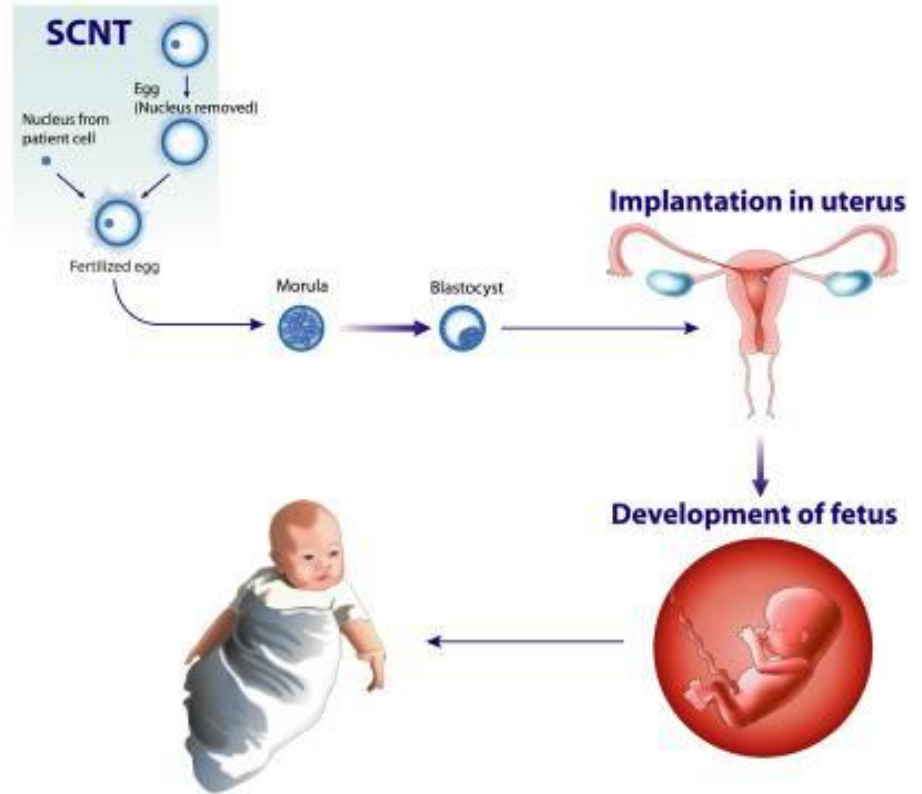


CLONAGE THÉRAPEUTIQUE

CLONAGE THÉRAPEUTIQUE



CLONAGE REPRODUCTIF

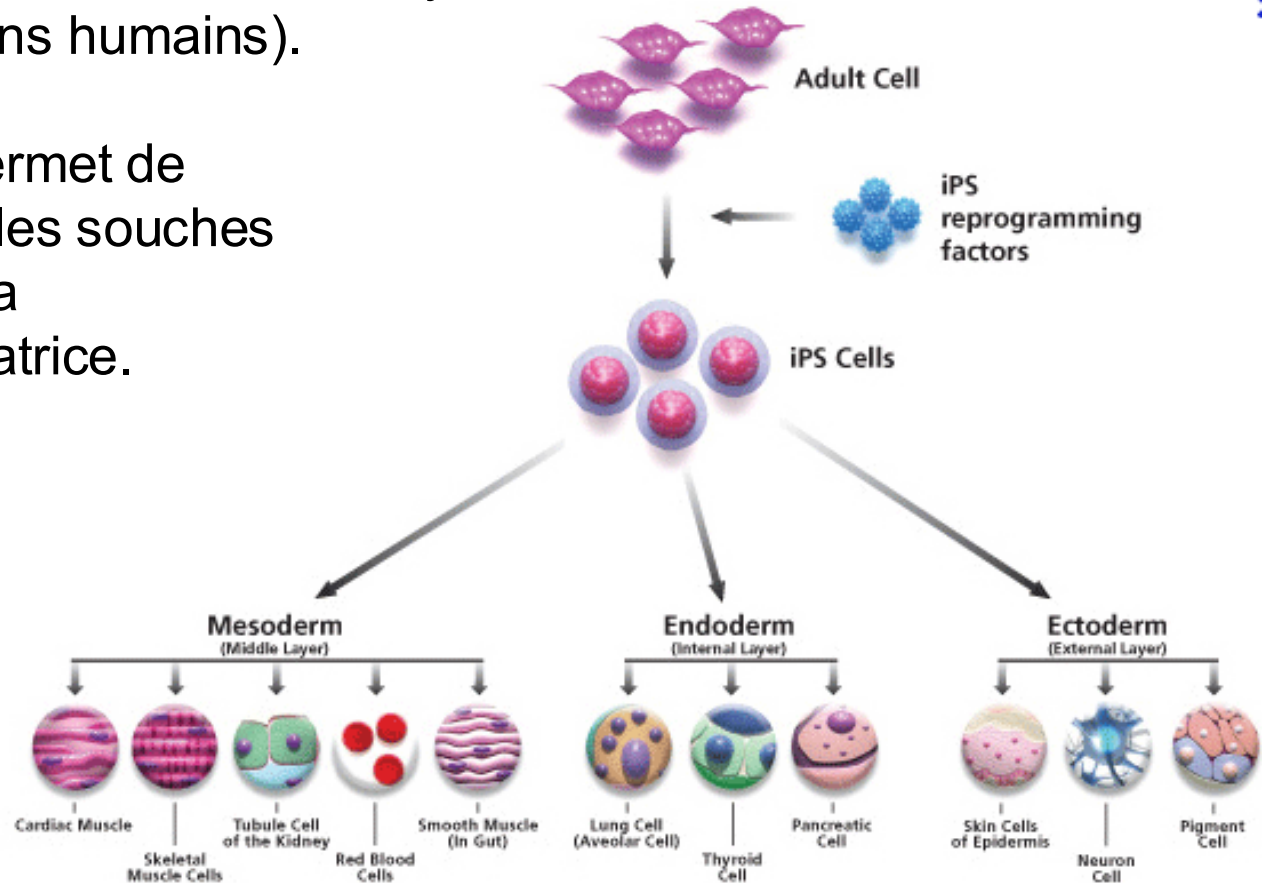


Conflit d'ordre éthique !!!

Les **cellules souches pluripotentes induites** (*iPS cells*) sont des cellules pluripotentes obtenues à partir de cellules somatiques adultes.

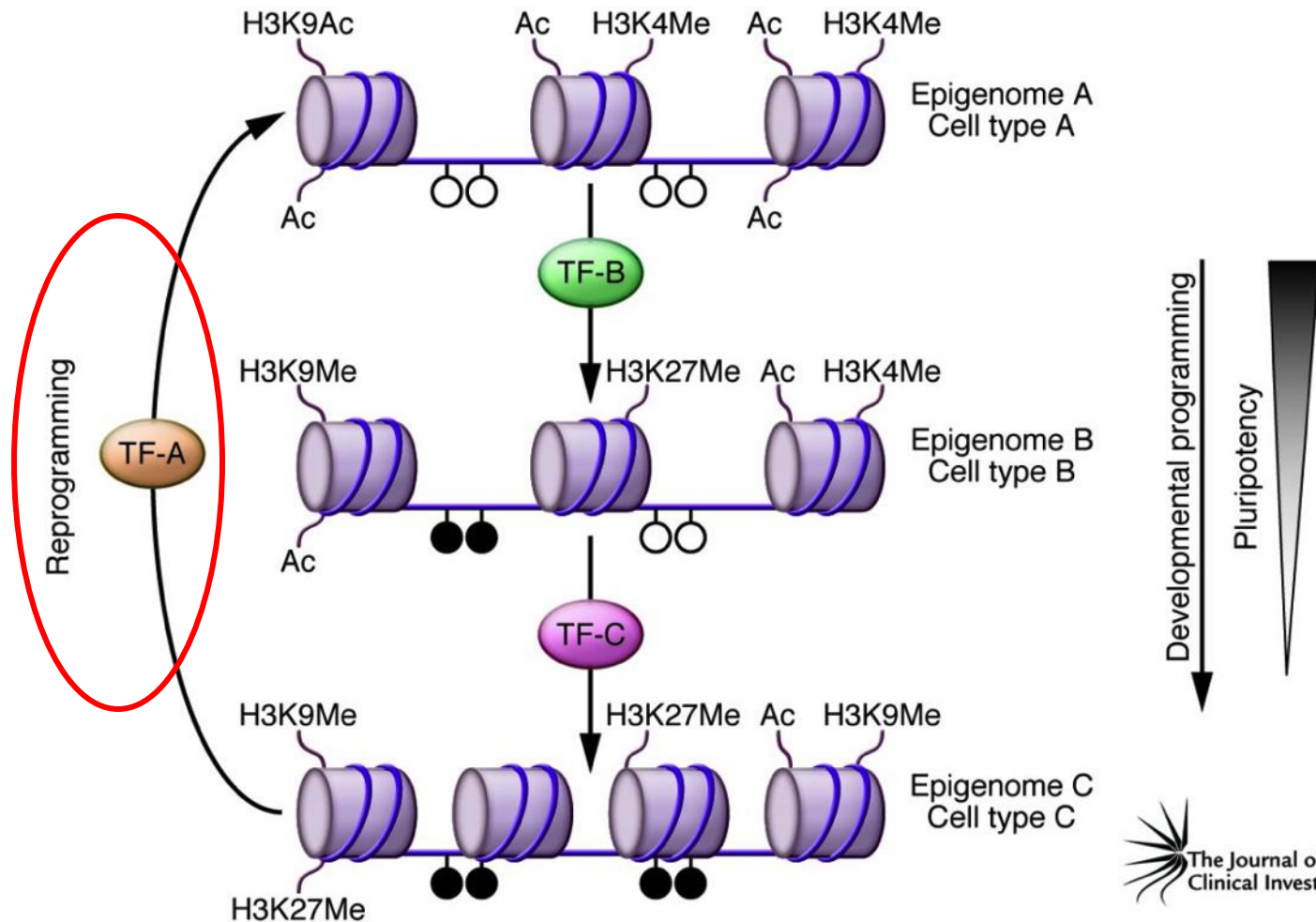
Elles permettent de contourner les problèmes éthiques liés à la production de cellules souches embryonnaires (clonage d'embryons humains).

Cette technique permet de fabriquer des cellules souches "à la carte » pour la médecine régénératrice.



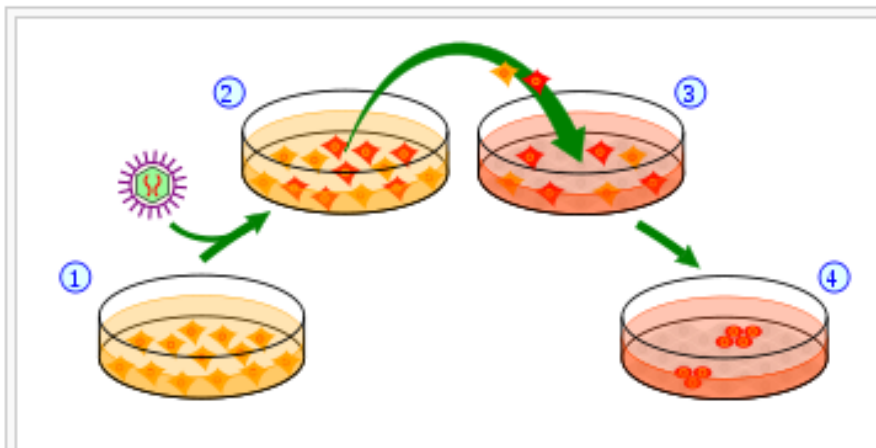
(2006)

La *reprogrammation cellulaire* vers l'état de non-différenciation
peut se faire
par *effacement des marques épigénétiques*
et forçant l'expression de facteurs de transcription du développement



Production de cellules iPS cells (cellules souches pluripotentes induites) :

par transfection (avec des retrovirus) de certains “stem cell-associated” gènes dans des cellules non pluripotentes (p.ex.. fibroblastes adultes): régulateurs de la transcription comme **Oct-3/4** (Pouf51), **Nanog** et **Sox2**, entre autres. Après 3–4 semaines, quelques-unes parmi les cellules acquièrent la morphologie et les traits biochimiques typiques des cellules souches pluripotentes.



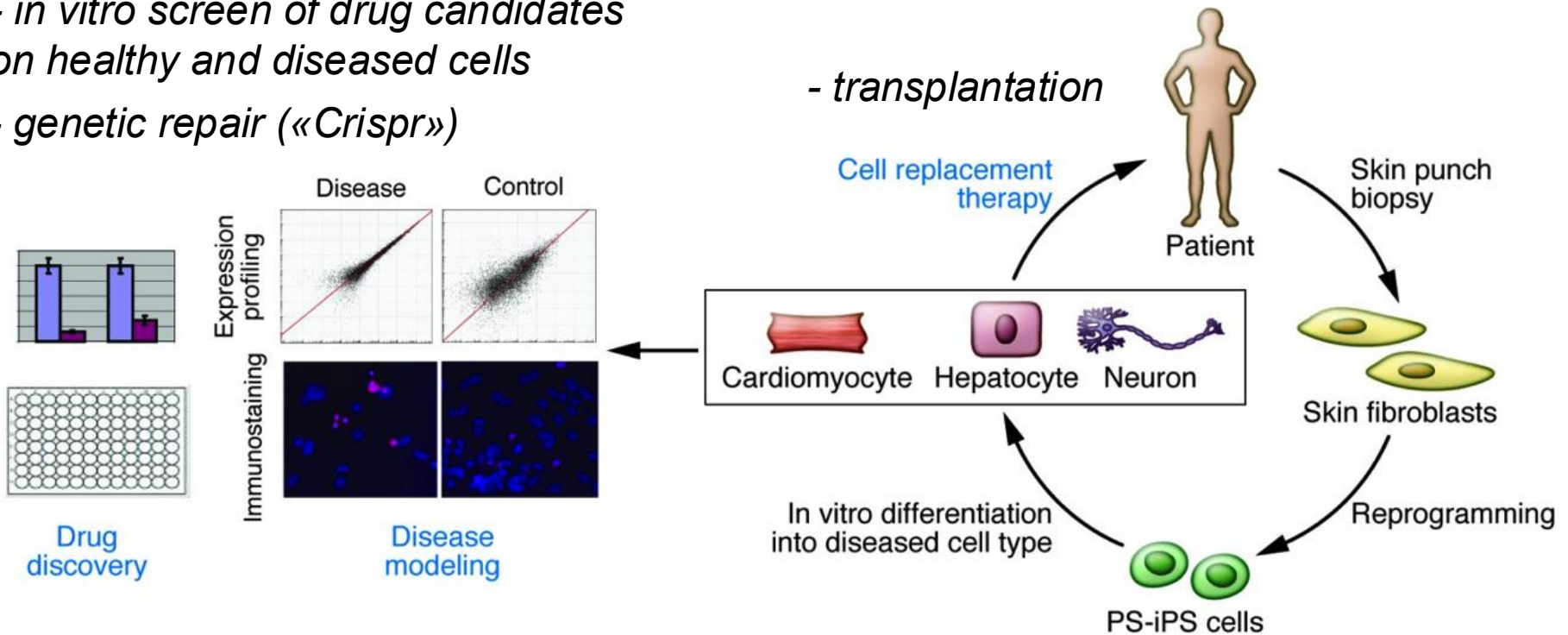
A scheme of the generation of induced pluripotent stem (iPS) cells. (1) Isolate and culture donor cells. (2) Transfect stem cell-associated genes into the cells by viral vectors. Red cells indicate the cells expressing the exogenous genes. (3) Harvest and culture the cells according to ES cell culture, using mitotically inactivated **feeder cells** (lightgray). (4) A small subset of the transfected cells become iPS cells and generate ES-like colonies.



➔ *Nanog*, *Oct4* et *Sox2* sont fortement exprimés dans l'épiblaste !!!

Pertinence clinique des cellules iPS. La technologie des cellules iPS a des applications potentielles passionnantes dans la modélisation des maladies et la découverte de médicaments. La thérapie de remplacement cellulaire avec des cellules saines dérivées de cellules iPS est également un développement futur possible. Les mutations génétiques peuvent être ciblées par des approches de thérapie génique avant ou après reprogrammation.

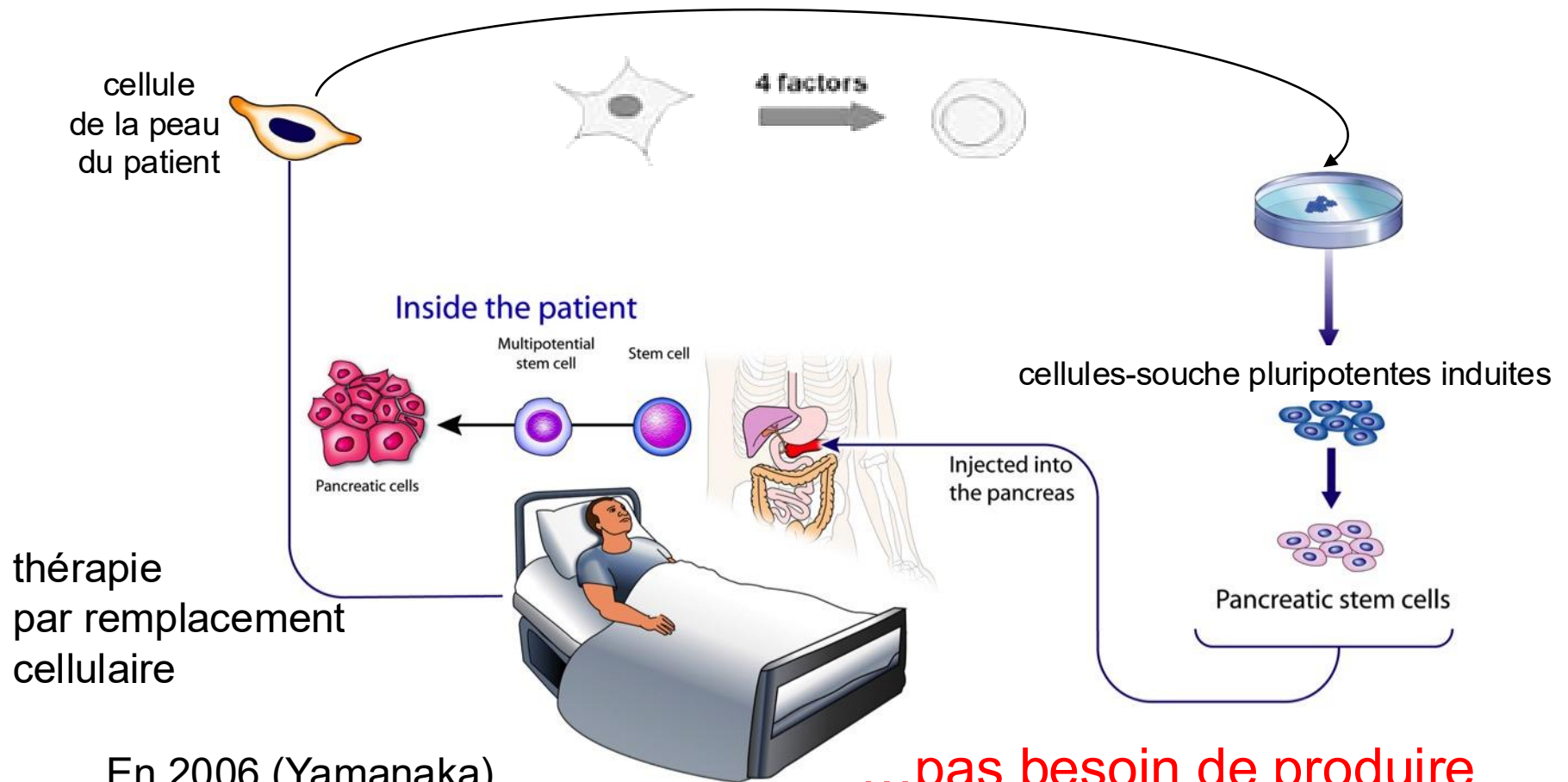
- *in vitro* screen of drug candidates on healthy and diseased cells
- genetic repair («Crispr»)



Cellules « iPS » (induced Pluripotent Stem Cells)

= cellules souches pluripotentes induites

par « reprogrammation » de cellules adultes différenciées !!!



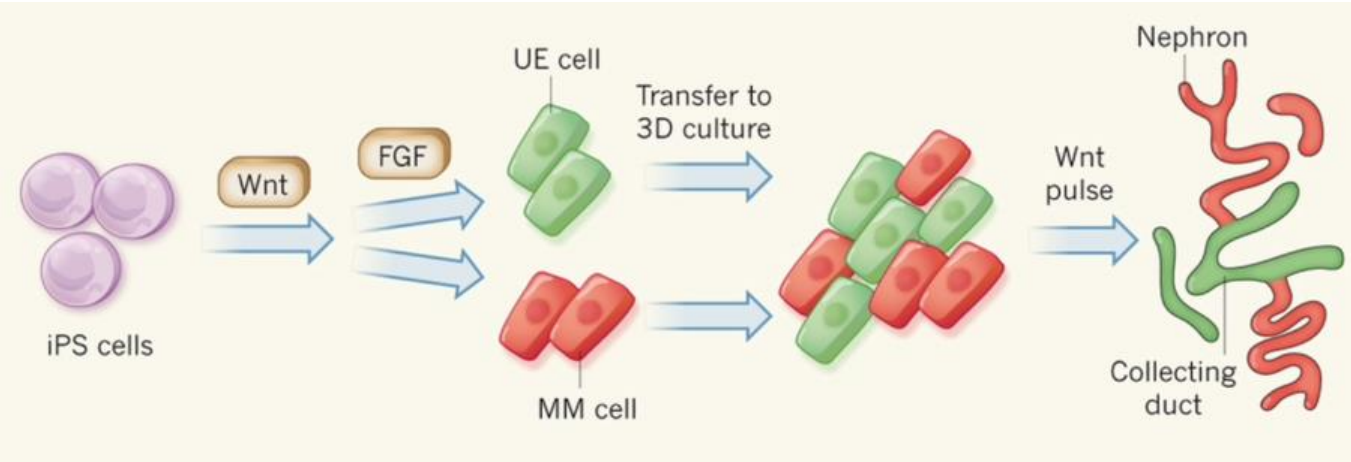
En 2006 (Yamanaka)
Prix Nobel en 2012 !!!

...pas besoin de produire
des embryons par clonage !!!



Generation of kidney organoids from human iPS cells

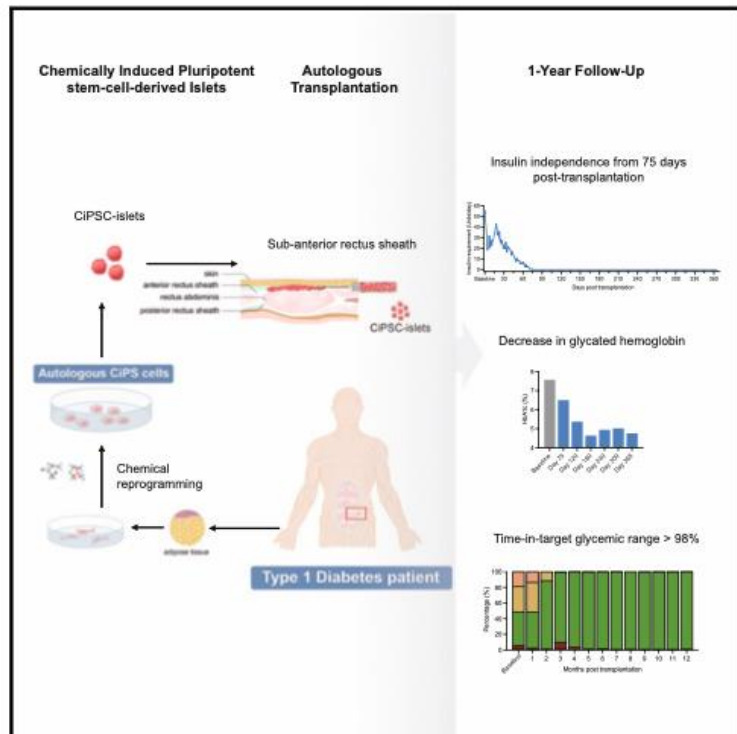
22 October 2015
Vol 526 | Issue No 7574



Transplantation of chemically induced pluripotent stem-cell-derived islets under abdominal anterior rectus sheath in a type 1 diabetes patient

Wang et al., 2024, *Cell* 187, 6152–6164
October 31, 2024 © 2024 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.09.004>

Chemically induced stem-cell-derived islets were transplanted beneath the abdominal anterior rectus sheath in one patient with type 1 diabetes, resulting in tolerable safety and promising restoration of exogenous-insulin-independent glycemic control at 1-year follow-up.

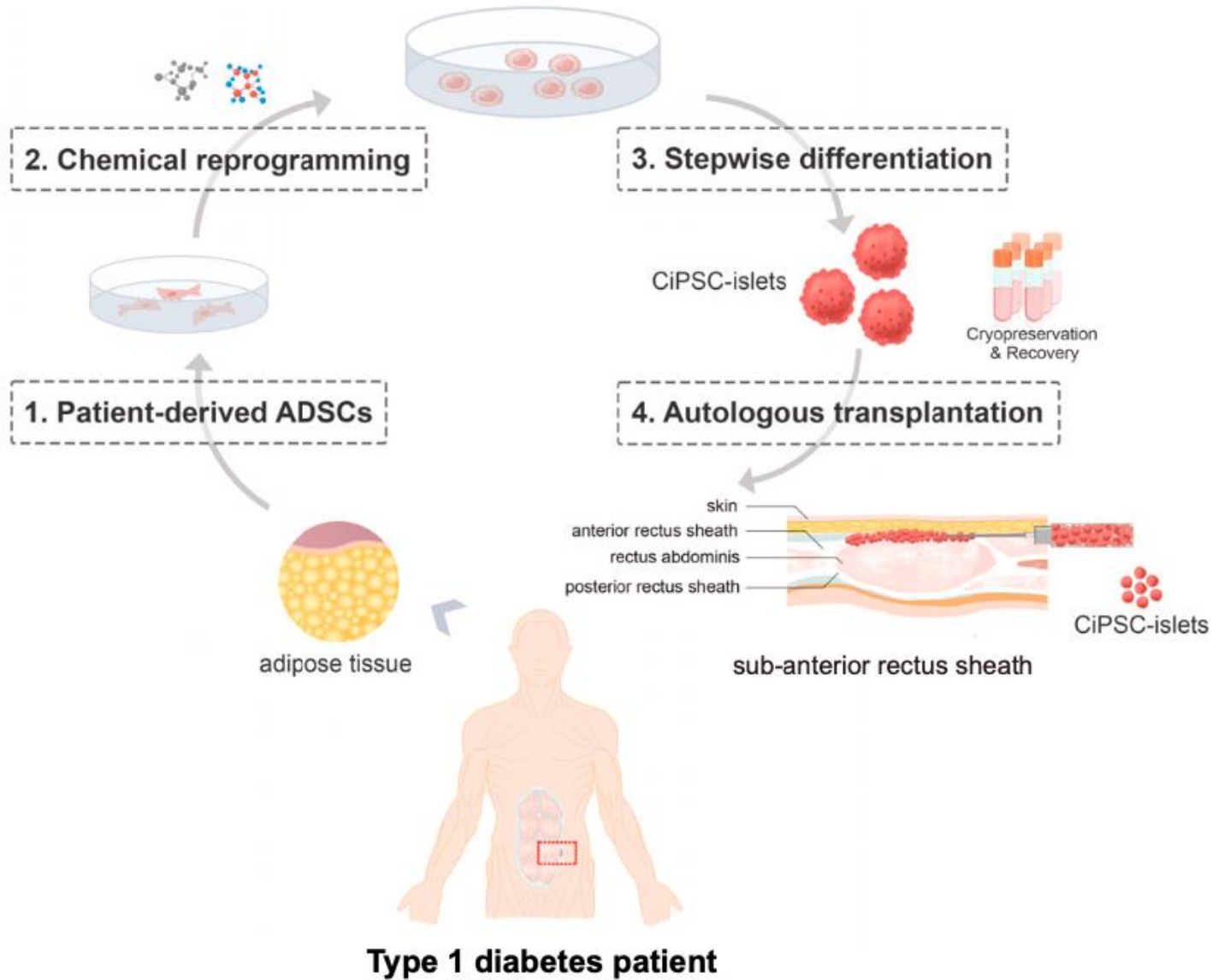


Highlights

- Patient-derived islets were generated with chemically induced pluripotent stem cells
- Transplantation of these islets to an abdominal site led to engraftment in one patient
- Exogenous insulin-independent glycemic control was restored in the patient
- All safety and efficacy clinical endpoints were met at 1-year follow-up of the patient

31 octobre 2024

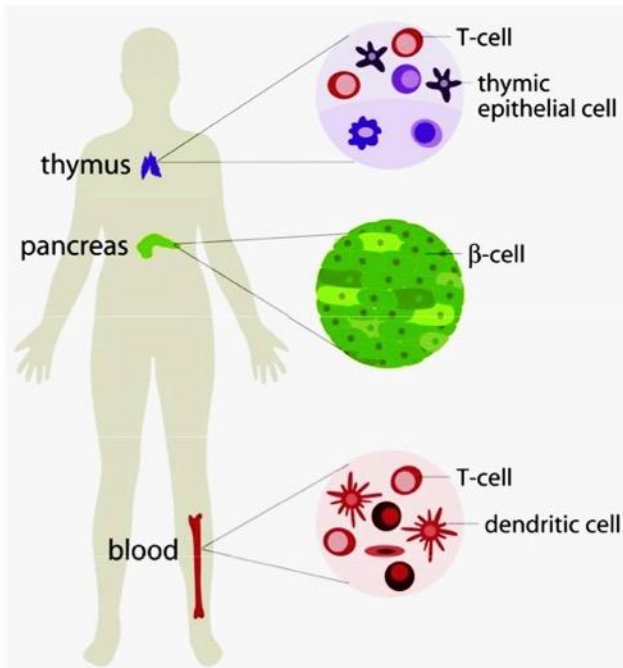
Autologous CiPS cells



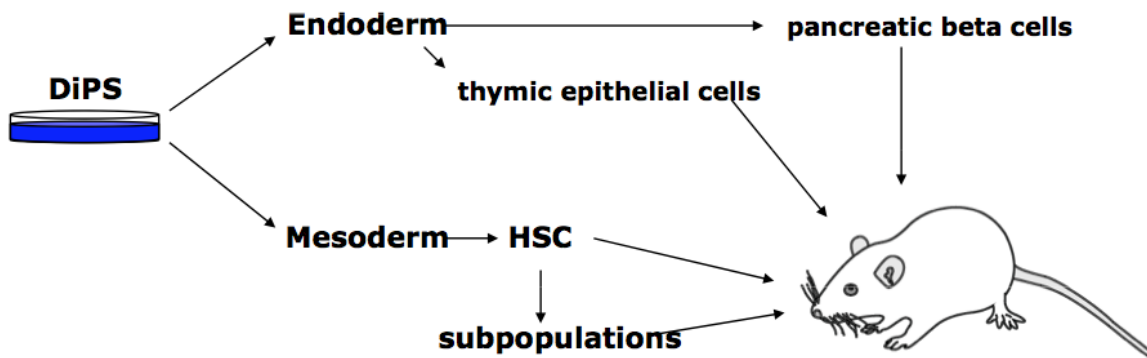
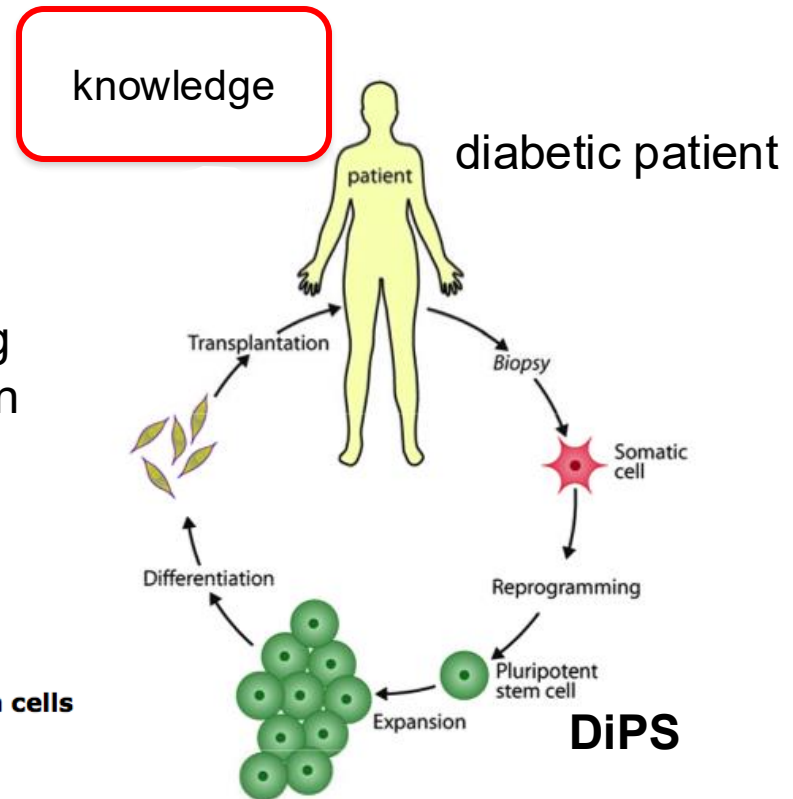
Regenerative Medicine for Diabetes

by generating surrogate cells, for cell replacement

(“*ex vivo cell reprogramming*”)



disease modeling
or *recapitulation* in
humanized mice



...vers des nouvelles thérapies pour traiter la stérilité féminine...
via la production d'ovocytes par reprogrammation cellulaire

Reconstitution *in vitro* of the entire cycle of the mouse female germ line

Orie Hikabe^{1*}, Nobuhiko Hamazaki¹, Go Nagamatsu¹, Yayoi Obata², Yuji Hirao³, Norio Hamada^{1,4}, So Shimamoto¹, Takuya Imamura¹, Kinichi Nakashima¹, Mitinori Saitou^{5,6,7,8} & Katsuhiko Hayashi^{1,9*}

The female germ line undergoes a unique sequence of differentiation processes that confers totipotency to the egg^{1,2}. The reconstitution of these events *in vitro* using pluripotent stem cells is a key achievement in reproductive biology and regenerative medicine. Here we report successful reconstitution *in vitro* of the entire process of oogenesis from mouse pluripotent stem cells. Fully potent mature oocytes were generated in culture from embryonic stem cells and from induced pluripotent stem cells derived from both embryonic fibroblasts and adult tail tip fibroblasts. Moreover, pluripotent stem cell lines were re-derived from the eggs that were generated *in vitro*, thereby reconstituting the full female germline cycle in a dish. This culture system will provide a platform for elucidating the molecular mechanisms underlying totipotency and the production of oocytes of other mammalian species in culture.

One of the key goals in developmental and reproductive biology is to reconstitute the entire process of gametogenesis in culture. Specifically,

the combination of media yielded a high number of primary oocytes with a follicle structure in preliminary culture experiments (Extended Data Fig. 1a). To prevent multiple oocyte follicle formation such as that seen frequently in culture (Extended Data Fig. 1b), we added the oestrogen inhibitor ICI182780 to the culture⁹. The rOvaries were filled throughout with follicle structures, each of which possesses a single oocyte, in an ICI182780-dependent manner (Extended Data Fig. 1b, c). During IVDi culture, BV, a marker of early PGCs¹⁰, was detectable at 3 days of culture, but became weak after one week of culture (Fig. 1b). At two weeks of culture, BV disappeared and SC—a marker of both oocytes and PGCs—became prominent in rOvaries, and at three weeks of culture, a number of SC-positive primary oocytes were observed in rOvaries (Fig. 1b). The close observation of IVDi revealed that clusters of PGCLCs were formed by 5 days of culture and gradually fragmented from 5 to 9 days, after which, follicles were formed around 11 days of culture (Extended Data Fig. 2a). Foxl2, a functional marker of granulosa

10 novembre 2016

Cite as: C. Yamashiro *et al.*, *Science*
10.1126/science.aat1674 (2018).

Generation of **human** oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro

Chika Yamashiro^{1,2}, Kotaro Sasaki^{1,2}, Yukihiro Yabuta^{1,2}, Yoji Kojima^{1,2,3,4}, Tomonori Nakamura^{1,2}, Ikuhiro Okamoto^{1,2}, Shihori Yokobayashi^{1,2,4}, Yusuke Murase^{1,2}, Yukiko Ishikura^{1,2}, Kenjiro Shirane^{5,6}, Hiroyuki Sasaki^{5,6}, Takuya Yamamoto^{3,4,7}, Mitinori Saitou^{1,2,3,4*}

¹Department of Anatomy and Cell Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. ²JST, ERATO, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. ³Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Yoshida-Ushinomiya-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. ⁴Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. ⁵Division of Epigenomics, Medical Institute of Bioregulation, and Epigenome Network Research Center, Kyushu University, Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. ⁶Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. ⁷AMED-CREST, AMED, 1-7-1 Otemachi, Chiyoda-ku, Tokyo, 100-0004, Japan.

*Corresponding author. Email: saitou@anat2.med.kyoto-u.ac.jp

Human in vitro gametogenesis may transform reproductive medicine. Human pluripotent stem cells (hPSCs) have been induced into primordial germ cell-like cells (hPGCLCs); however, further differentiation to a mature germ cell has not been achieved. Here, we show that hPGCLCs differentiate progressively into oogonia-like cells during a long-term in vitro culture (~four months) in xenogeneic reconstituted ovaries with mouse embryonic ovarian somatic cells. The hPGCLC-derived oogonia display hallmarks of epigenetic reprogramming, i.e., genome-wide DNA demethylation, imprint erasure, and extinguishment of aberrant DNA methylation in hPSCs, and acquire an immediate precursory state for meiotic recombination. Furthermore, the inactive X chromosome shows a progressive demethylation and reactivation, albeit partially. These findings establish the germline competence of hPSCs and provide a critical step toward human in vitro gametogenesis.



Induction of experimental cell division to generate cells with reduced chromosome ploidy

Received: 27 February 2025

Accepted: 25 July 2025

Published online: 30 September 2025

Nuria Marti Gutierrez¹, Aleksei Mikhailchenko¹, Maria Shishimorova¹, Daniel Frana¹, Crystal Van Dyken¹, Ying Li¹, Hong Ma¹, Amy Koski¹, Dan Liang^{1,4}, Sang-Goo Lee¹, Daniel Eyberg¹, Zahra Safaei¹, Eunju Kang², Yeonmi Lee², Thomas O'Leary³, David Lee³, Sacha Krieg³, Diana Wu³, Elizabeth Rubin³, Paula Amato^{1,3} ✉ & Shoukhrat Mitalipov¹ ✉

ovules humains fécondables
créés
à partir de cellules de la peau
d'une femme grâce à la
technique SCNT

Depuis des années, des chercheurs travaillent à la création d'ovules pour les femmes qui en sont dépourvues. Jusqu'à présent, leurs efforts se sont limités aux souris. Dans un article récemment paru dans *Nature Communications*, une équipe de scientifiques annonce avoir réussi.

En utilisant les noyaux des cellules cutanées avant le doublement chromosomique, puis en les faisant se diviser prématurément une fois à l'intérieur des ovules, l'équipe du Dr Mitalipov est parvenue à initier un nouveau type de division cellulaire, qu'ils appellent mitoméiose. Ce processus force les noyaux, qui subiraient normalement une mitose, à subir une division réductionnelle. Ils ont ainsi créé 82 ovules issus du transfert nucléaire de cellules somatiques (SCNT), qu'ils ont ensuite fécondés avec des spermatozoïdes. Cinq d'entre eux ont atteint le stade de blastocyste avant l'arrêt de l'expérience.

génération d'embryons de souris avec deux génomes paternels (androgénotes)

Cell Stem Cell

ARTICLE

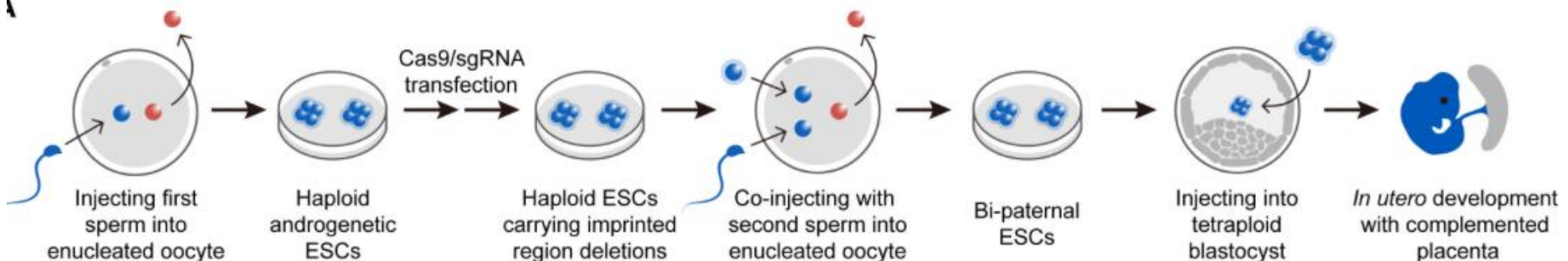
Adult bi-paternal offspring generated through direct modification of imprinted genes in mammals

Li et al., 2025, Cell Stem Cell 32, 361–374

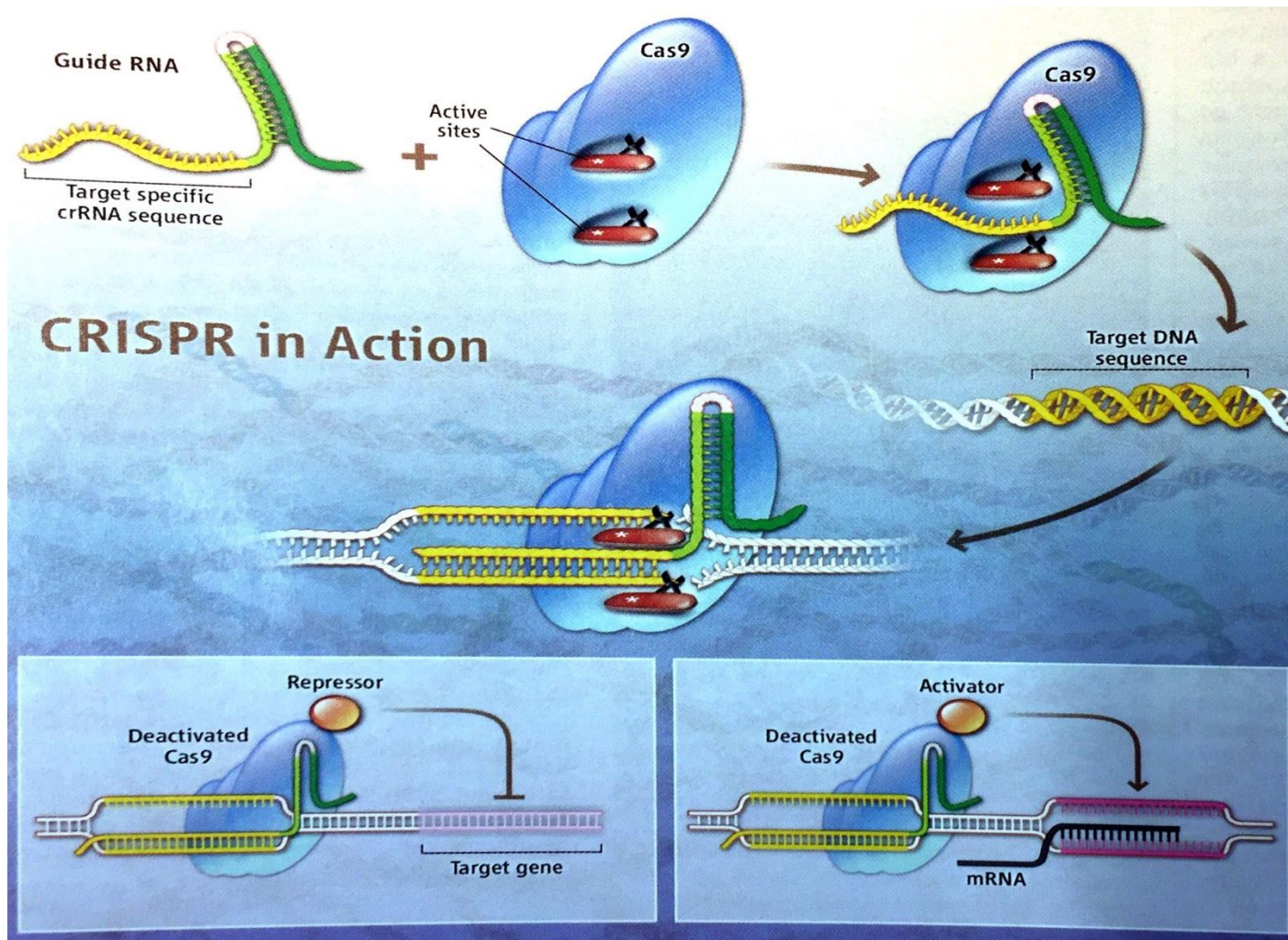
March 6, 2025 © 2025 The Authors. Published by Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2025.01.005>

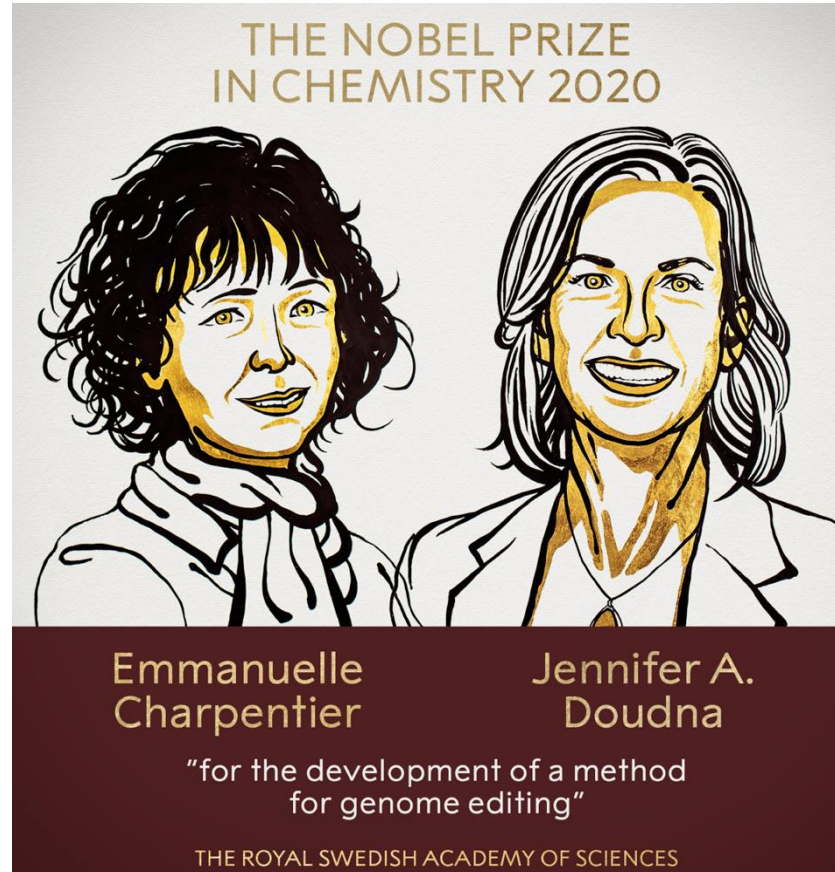
“En utilisant des embryons de souris “bipaternelles”, présentant de graves anomalies d'empreinte génomique et non viables, nous avons introduit des mutations et des modifications régulatrices au niveau de 20 loci clés soumis à empreinte, obtenant ainsi le développement d'animaux adultes, malgré un taux de survie relativement faible. Ces résultats démontrent que les anomalies d'empreinte génomique constituent un obstacle majeur à la reproduction unisexuée chez les mammifères. De plus, cette approche peut améliorer significativement le développement des cellules souches embryonnaires et des animaux clonés, ouvrant des *perspectives prometteuses pour les progrès de la médecine régénérative.*”



La modification du génome “ à la carte ”, *in vitro* ou *in vivo* : CRISPR/Cas9



CRISPR / Cas9

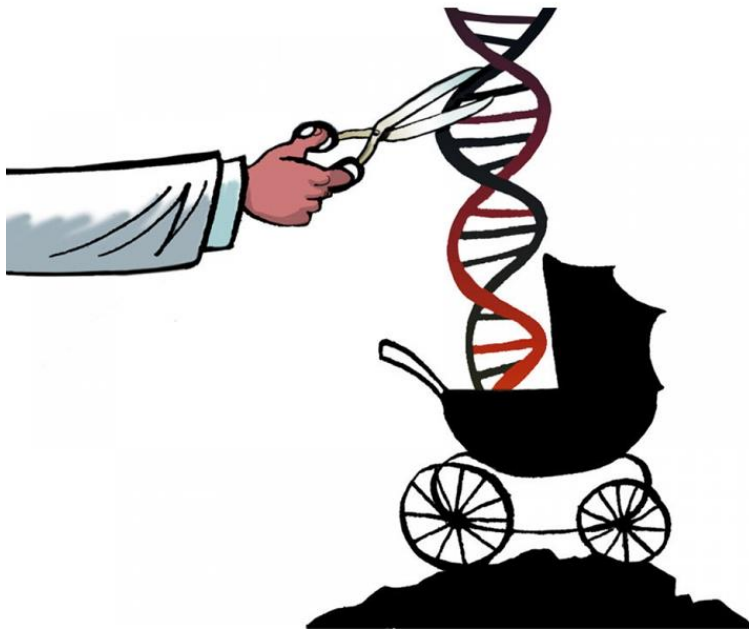


The era of human gene-editing may have begun. Why that is worrying

A Chinese scientist claims to have edited the genomes of twin baby girls

Dec 1st 2018

...le danger
de l'eugénisme !



Peter Schrank

la « science de l'amélioration des lignées animales » appliquée aux êtres humains, sur le modèle de l'élevage sélectif des animaux (Francis Galton, XIX^e siècle)...

HUMANITY'S POWER to control the four-letter code of life has advanced by leaps and bounds. A new gene-editing technology called CRISPR-Cas9, which was not discovered until 2012, has been the subject of particular excitement. It allows DNA to be edited easily, raising hopes that it could eventually be used to relieve human suffering. This week, however, CRISPR has caused more unease than optimism, because of claims by a Chinese scientist that he edited the genomes of twin girls when they were embryos, as part of IVF treatment.

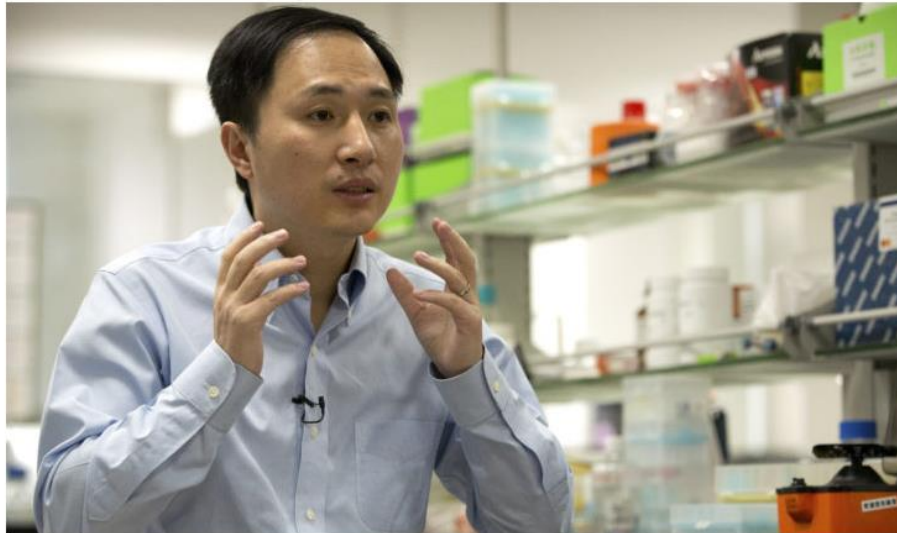
2018: un chercheur chinois a utilisé CRISPR, de façon illégale, pour modifier le génome de deux embryons, après FIV. Il est en prison (... *bon, il est ressorti maintenant !*)

Il avait inactivé un gène (CCR5) pour conférer aux embryons une résistance au virus du SIDA. Ces deux embryons sont devenus deux fillettes qui vont très bien.

Après coup, on a découvert, avec des souris KO, que ce gène CCR5 est impliqué dans la suppression (effacement) de la mémoire et dans la capacité des neurones à établir des nouvelles connexions (synapses)...

Chinese researcher claims birth of first gene-edited babies — twin girls

By Associated Press Nov. 25, 2018



Chinese scientist He Jiankui claims he helped make world's first genetically edited babies: twin girls whose DNA he said he altered.

HUMAN GENE EDITING

March 2015: Chinese researchers become the first to edit genes in a human embryo.

June 2016: He Jiankui launches a project to edit genes in human embryos, with the goal of a live birth.

March 2017: He starts recruiting couples (each with an HIV-positive father) for the experiments.

Early November 2018: Gene-edited twin girls are reportedly born, and a second pregnancy with a third gene-edited embryo is established.

25–26 November 2018: The *MIT Technology Review* reveals the existence of the research programme; the Associated Press quickly goes public with the story of the girls' birth.

28 November 2018: He offers details about his work at a gene-editing summit in Hong Kong and is roundly criticized.

November–December 2018: China's National Health Commission orders an investigation into He's work.

January 2019: He is censured by the Guangdong health ministry and fired from his university.

18 March 2019: A World Health Organization committee will meet to set guidelines for human gene editing.

August 2019: Third gene-edited baby expected.

rétinite pigmentaire (maladie génétique de l'oeil -cécité)

In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration

Keiichiro Suzuki^{1*}, Yuji Tsunekawa^{2*}, Reyna Hernandez-Benitez^{1,3*}, Jun Wu^{1,4*}, Jie Zhu^{5,6}, Euseok J. Kim⁷, Fumiyuki Hatanaka¹, Mako Yamamoto¹, Toshikazu Araoka^{1,4}, Zhe Li⁸, Masakazu Kurita¹, Tomoaki Hishida¹, Mo Li¹, Emi Aizawa¹, Shicheng Guo⁸, Song Chen⁸, April Goebel¹, Rupa Devi Soligalla¹, Jing Qu^{9,10}, Tingshuai Jiang^{6,11}, Xin Fu^{5,6}, Maryam Jafari⁶, Concepcion Rodriguez Esteban¹, W. Travis Berggren¹², Jeronimo Lajara⁴, Estrella Nuñez-Delgado⁴, Pedro Guillen^{4,13}, Josep M. Campistol¹⁴, Fumio Matsuzaki², Guang-Hui Liu^{10,15,16,17}, Pierre Magistretti³, Kun Zhang⁸, Edward M. Callaway⁷, Kang Zhang^{5,6,18,19} & Juan Carlos Izpisua Belmonte¹

Targeted genome editing via engineered nucleases is an exciting area of biomedical research and holds potential for clinical applications. Despite rapid advances in the field, *in vivo* targeted transgene integration is still infeasible because current tools are inefficient¹, especially for non-dividing cells, which compose most adult tissues. This poses a barrier for uncovering fundamental biological principles and developing treatments for a broad range of genetic disorders². Based on clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9 (CRISPR/Cas9)^{3,4} technology, here we devise a homology-independent targeted integration (HITI) strategy, which allows for robust DNA knock-in in both dividing and non-dividing cells *in vitro* and, more importantly, *in vivo* (for example, in neurons of postnatal mammals). As a proof of concept of its therapeutic potential, we demonstrate the efficacy of HITI in improving visual function using a rat model of the retinal degeneration condition retinitis pigmentosa. The HITI method presented here establishes new avenues for basic research and targeted gene therapies.

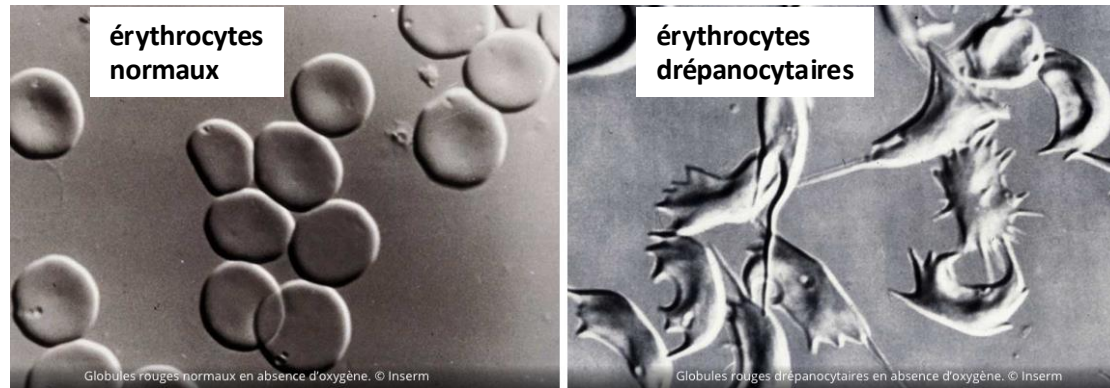
Site-specific transgene integration is typically achieved by the

methods¹³ using CRISPR/Cas9. To evaluate knock-in efficiencies we generated a GFP-correction HEK293 line (Fig. 1a). The absolute knock-in efficiencies via HDR, MMEJ-mediated targeted integration (precise integration into target chromosome (PITCh))¹³, or NHEJ-mediated targeted integration (designated herein as homology-independent targeted integration, or HITI) (Extended Data Fig. 1a), were presented as percentages of GFP⁺ or mCherry⁺ cells (Fig. 1a, b). We observed little to no knock-in events when using genome cut only (IRESmCherry-0c) and donor DNA cut only (IRESmCherry-MC-scramble) control donors (Fig. 1a, b and Extended Data Fig. 1b, c). Notably, we observed higher knock-in efficiency with HITI donors (IRESmCherry-1c, -2c and -MC; see below for definitions) than with an HDR donor (truncated GFP (tGFP) and IRESmCherry-HDR-0c), a PITCh donor (IRESmCherry-MH) or a HITI donor with homology arms (IRESmCherry-HDR-2c). Consistent with previous observations, inserted DNA devoid of bacterial backbone (IRESmCherry-2c and IRESmCherry-MC) resulted in less pronounced transgene silencing than DNA carrying bacterial sequences (IRESmCherry-1c) (Extended Data Fig. 1d, f)^{14,15}

(1^{er} décembre 2016)

Drépanocytose (anémie falciforme)

mutation sur un des gènes codant l'hémoglobine (un nucléotide du gène HBB, chaîne β de l'hémoglobine A; chr. 11)

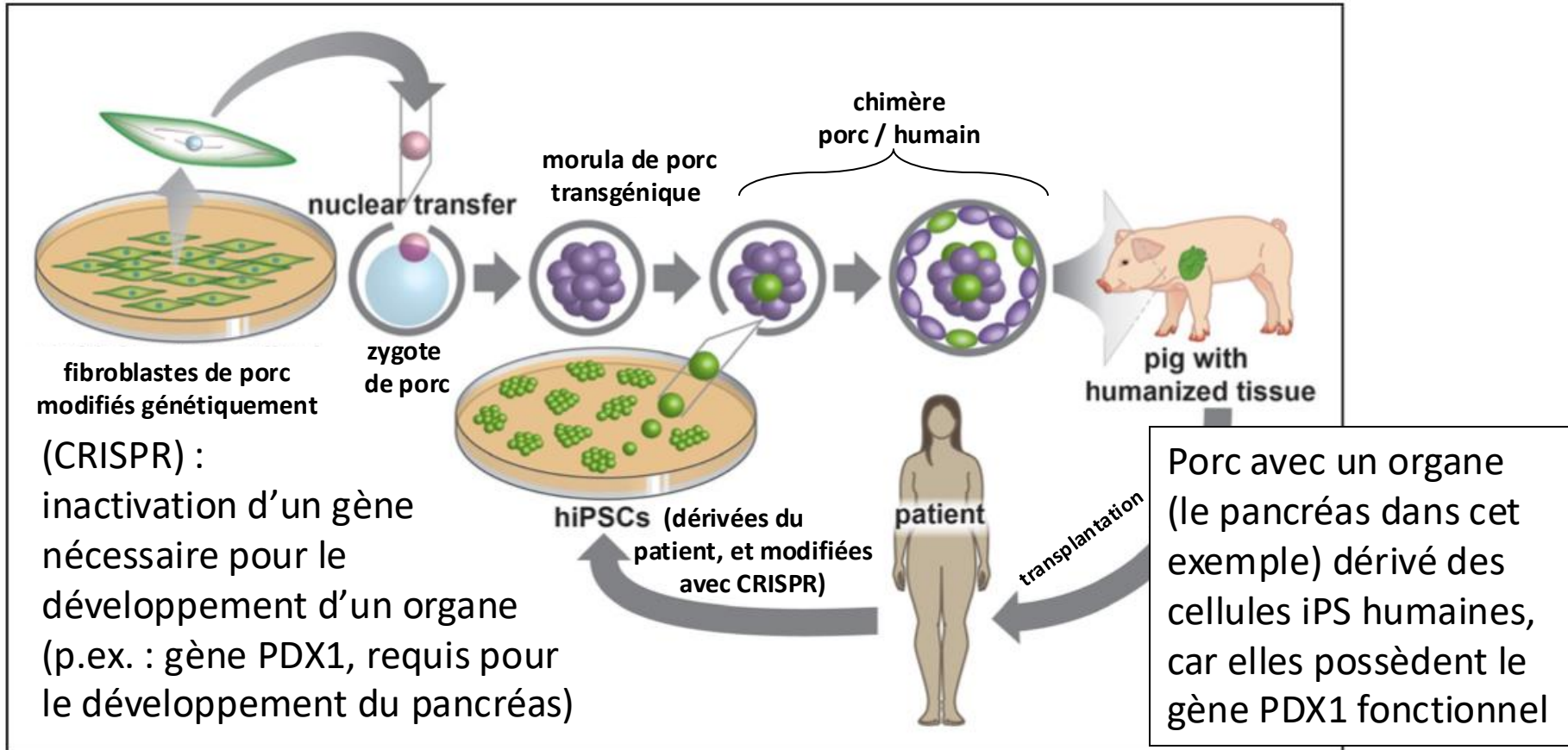


Des perspectives intéressantes grâce aux outils d'édition du génome (tel le système CRISPR-Cas9) :

l'idée est de les utiliser pour corriger directement la mutation responsable de la maladie, ou pour modifier les régions régulatrices, en particulier au niveau du gène BCL11A, afin d'inhiber la production de l'hémoglobine mutée au profit de l'hémoglobine foetale dont le gène est réprimé dès la naissance.

Concrètement, la mise en œuvre de ces approches passe par le recueil de cellules souches hématopoïétiques du patient, la réalisation de la modification génétique thérapeutique (insertion du gène normal ou suppression d'un gène régulateur de l'hémoglobine foetale), puis la réinjection des cellules modifiées dans l'organisme du patient après conditionnement (chimiothérapie myéloablatrice comme dans l'allogreffe).

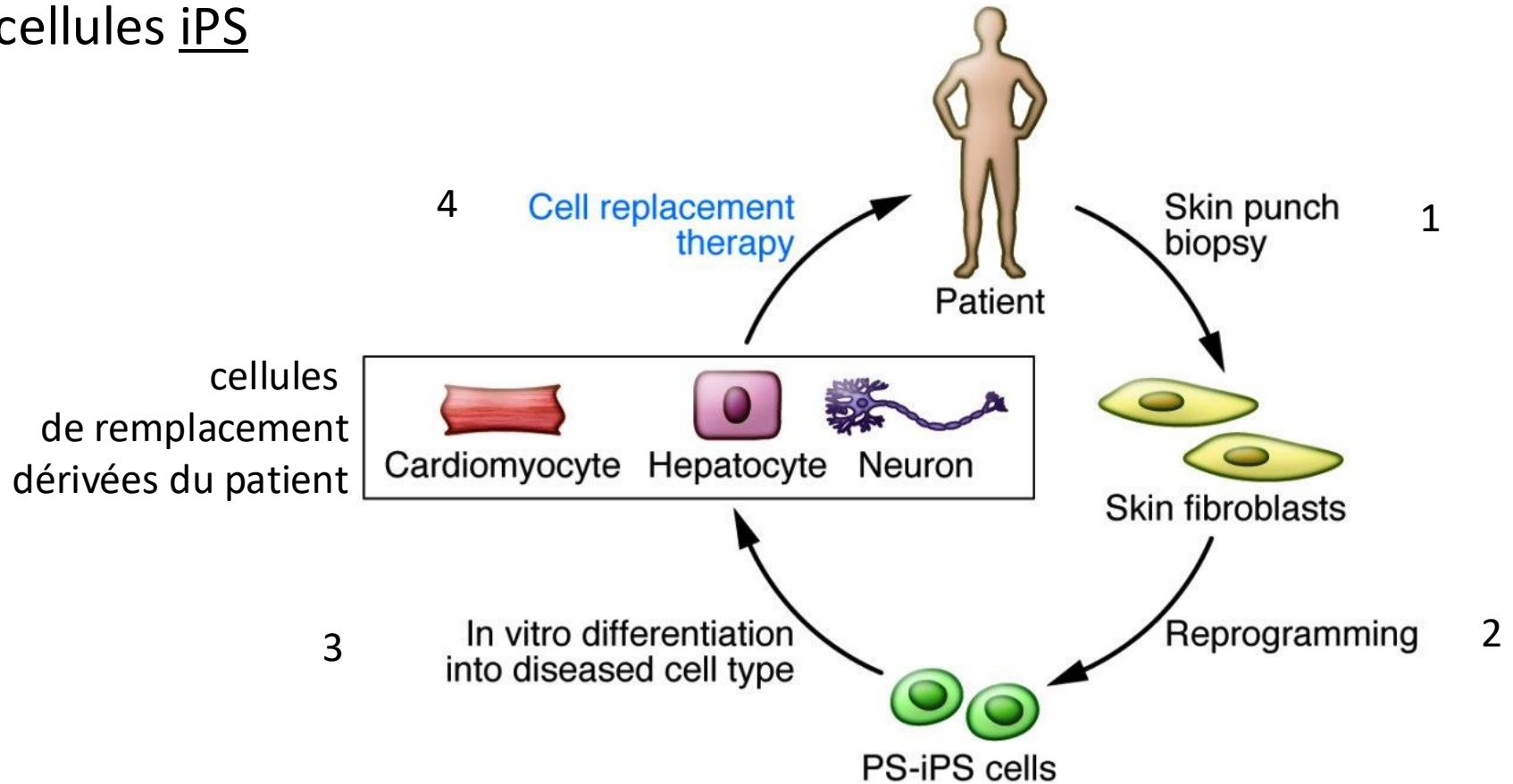
génération de “chimères inter-espèce” : porc / humain



...il est possible de générer des chimères porc/humain avec des cellules iPS humaines injectées dans des blastocystes transgéniques de porc, pour produire des organes “humanisés” ..., c.-à-d. dérivés uniquement des cellules iPS humaines.

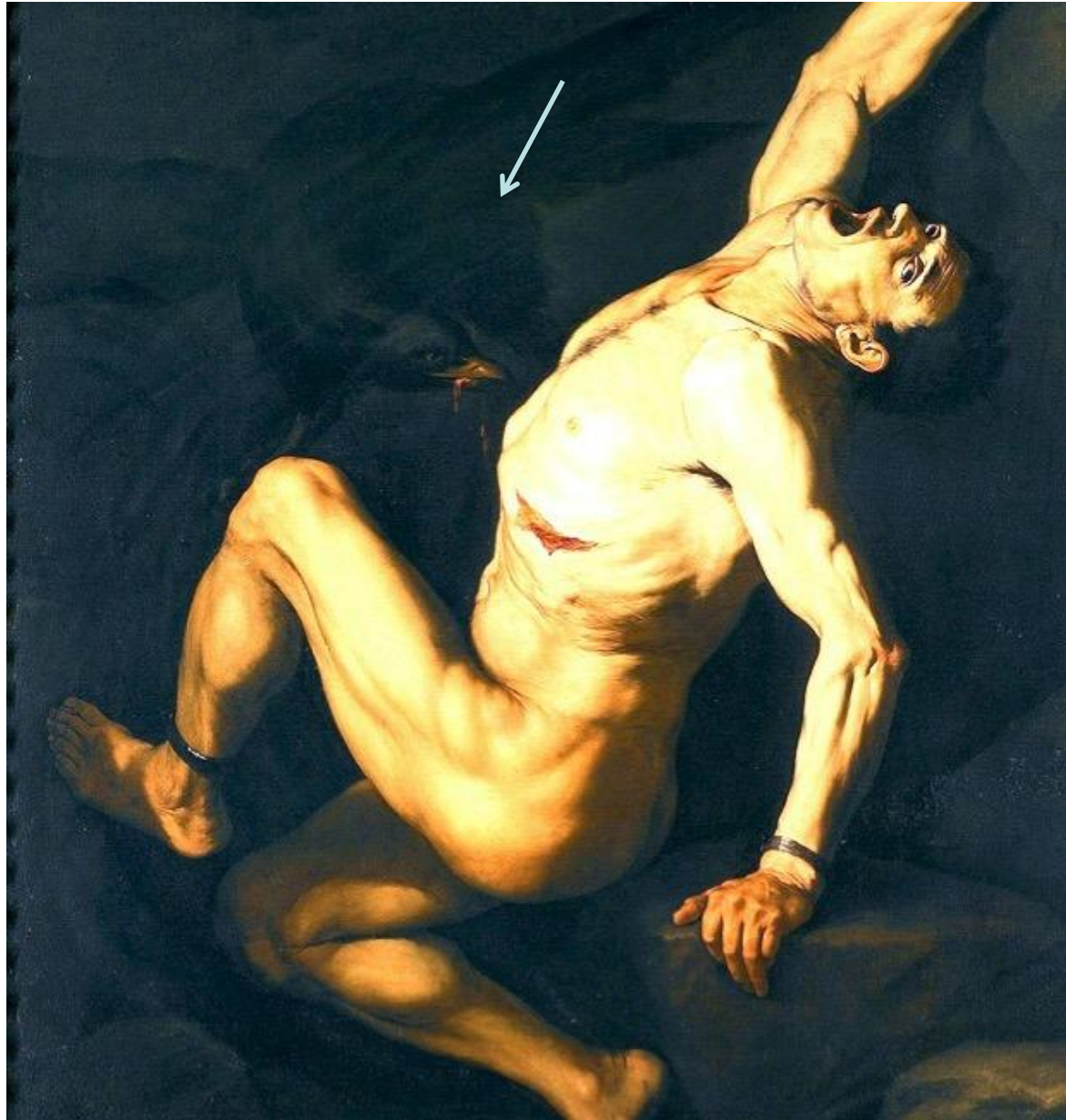
Médecine Régénérative: deux approches

- génération *ex vivo* de cellules de remplacement obtenues à partir de cellules souches dérivées du patient : moelle, cellules ES ou cellules iPS



- exploiter la capacité de régénération (intrinsèque) de l'organe

L'étonnante capacité de régénération du foie...



le Titan Prométhée

“Prometeo”, José de Ribera (1630)

Est-ce que le pancréas adulte peut
régénérer de nouvelles cellules à insuline
après les avoir perdues ?

*(c.-à-d., comme chez les patients
diabétiques type 1)*

➔ REGENERATION ?

Comment étudier la régénération pancréatique ?

souris transgéniques

Comment rendre une souris diabétique ?

Par élimination des cellules β ...

...en rendant **uniquement** les cellules β sensibles à une toxine,
dans une souris transgénique

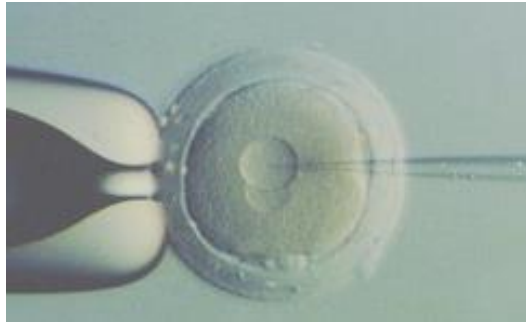
Deux types d'expériences chez la souris:

- ablation (= destruction) cellulaire
- traçage des lignages cellulaires

Modèle Transgénique
d'ablation inductible et rapide des cellules β :

sans inflammation ou auto-immunité

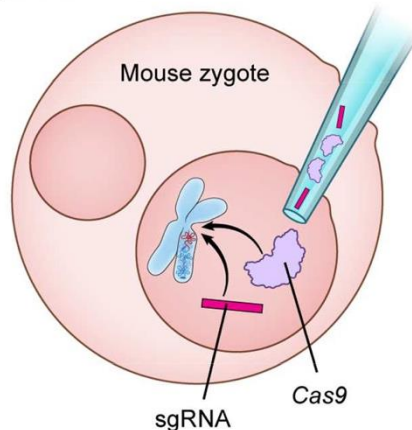
ZYGOTE MURIN



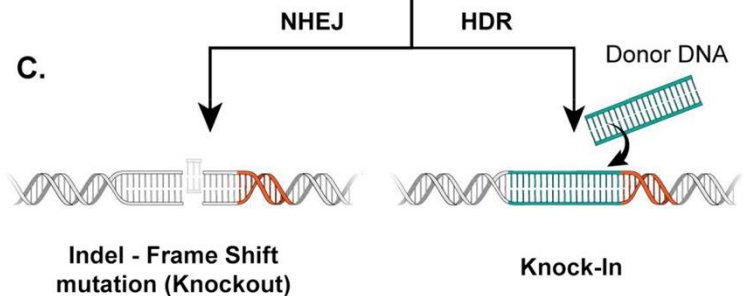
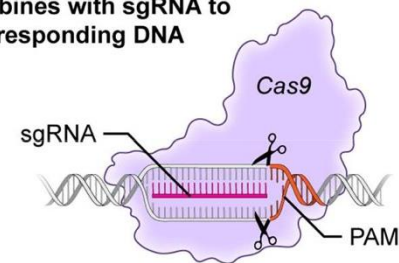
Production de souris transgéniques par micro-injection dans le zygote :

1. d'ADN (le « transgène ») (intégration au hasard : transgénèse «classique»), *ou mieux encore*
2. de Cas9 + guide RNA + l'ADN à insérer (intégration dirigée : souris «knock-in»)

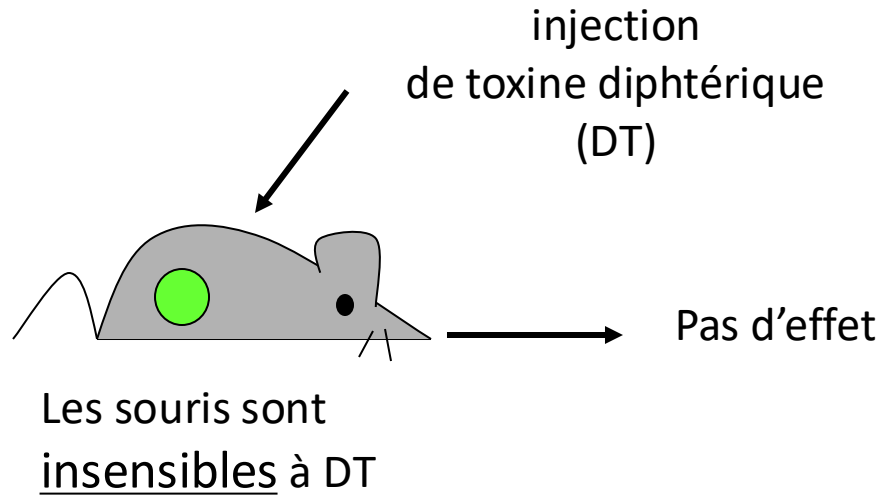
A. Pronuclear injection of Cas9 and sgRNA



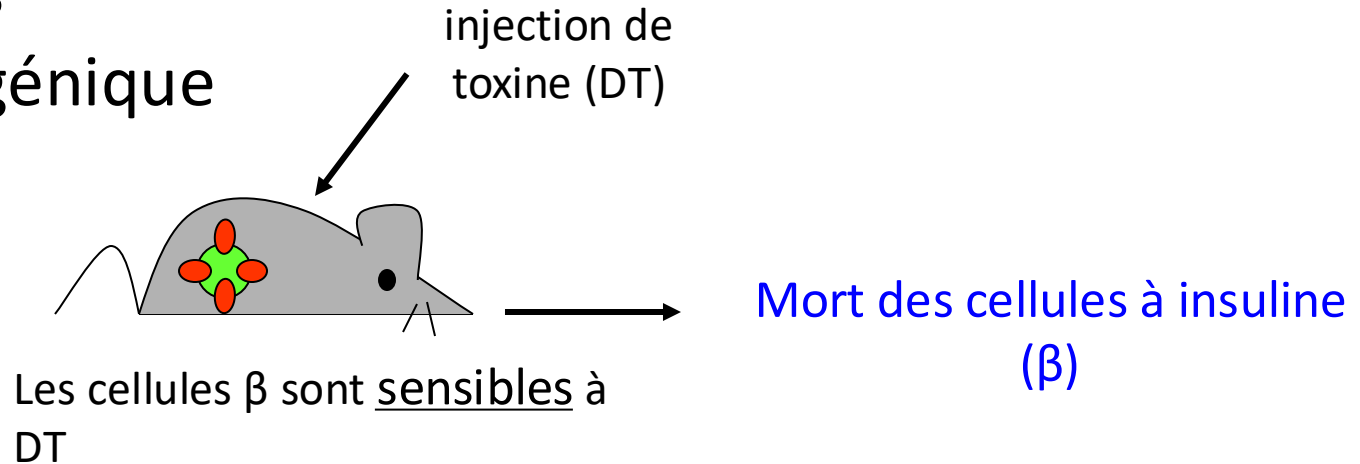
B. Cas9 combines with sgRNA to target corresponding DNA



Souris



Souris transgénique



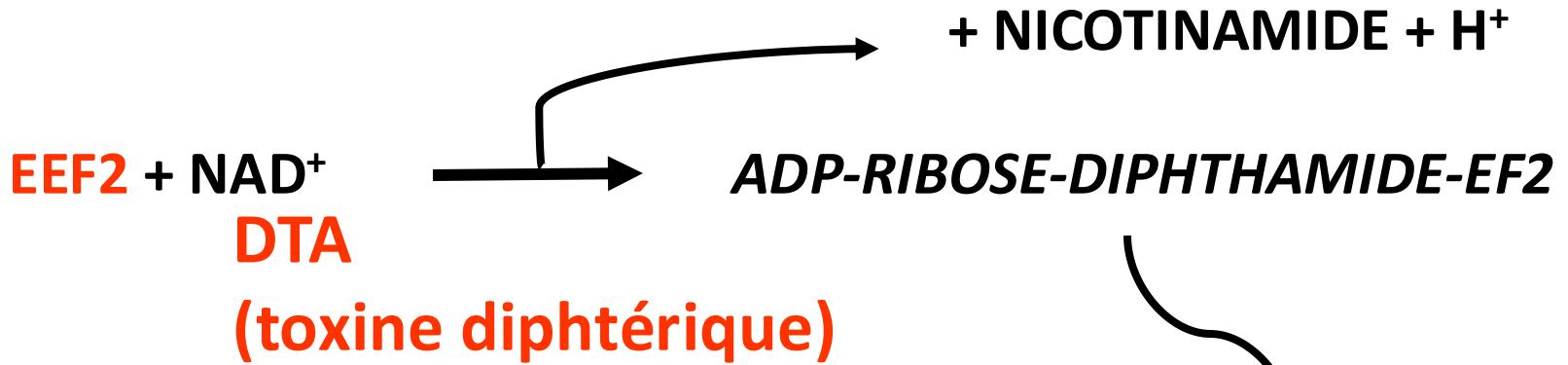
transgène: "RIP-DTR"

promoteur
du gène de l'insuline

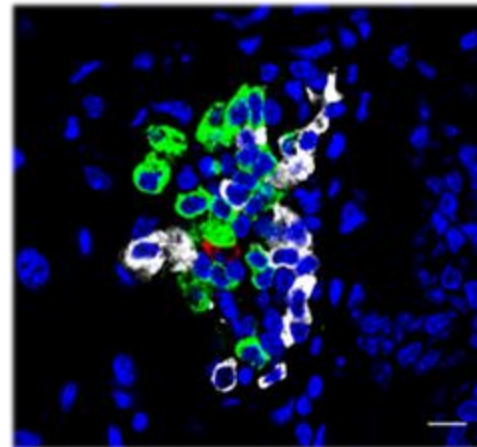
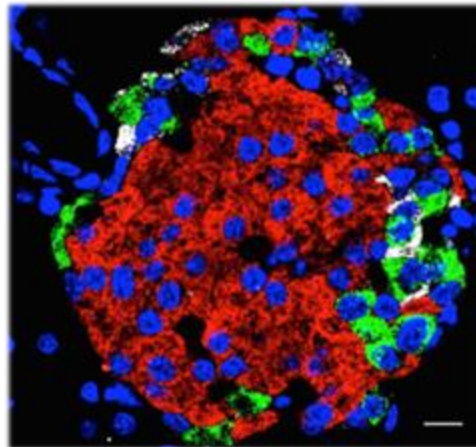
récepteur de la
toxine diphtérique (DTR)

(human HB-EGF)





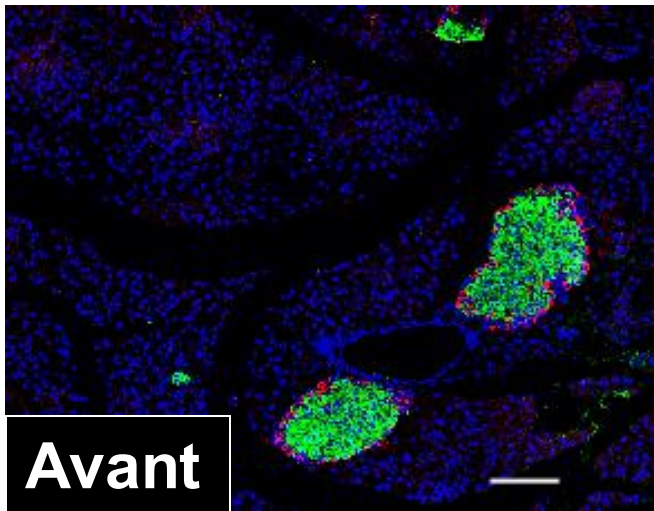
inhibition de la synthèse de protéines:
mort cellulaire (apoptose)



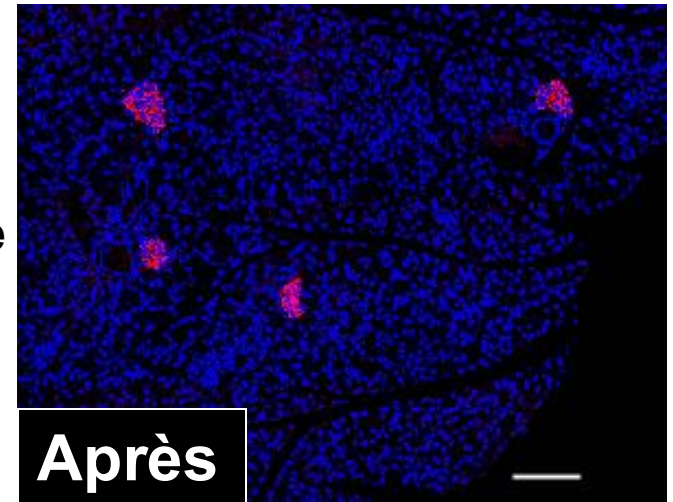
Insuline Glucagon
Somatostatine DAPI

Elimination des cellules β

Cellules β sensibilisées



injection
de toxine
diphthérique



Cellules à insuline: 100%

> 0,1% !



Souris "saine"

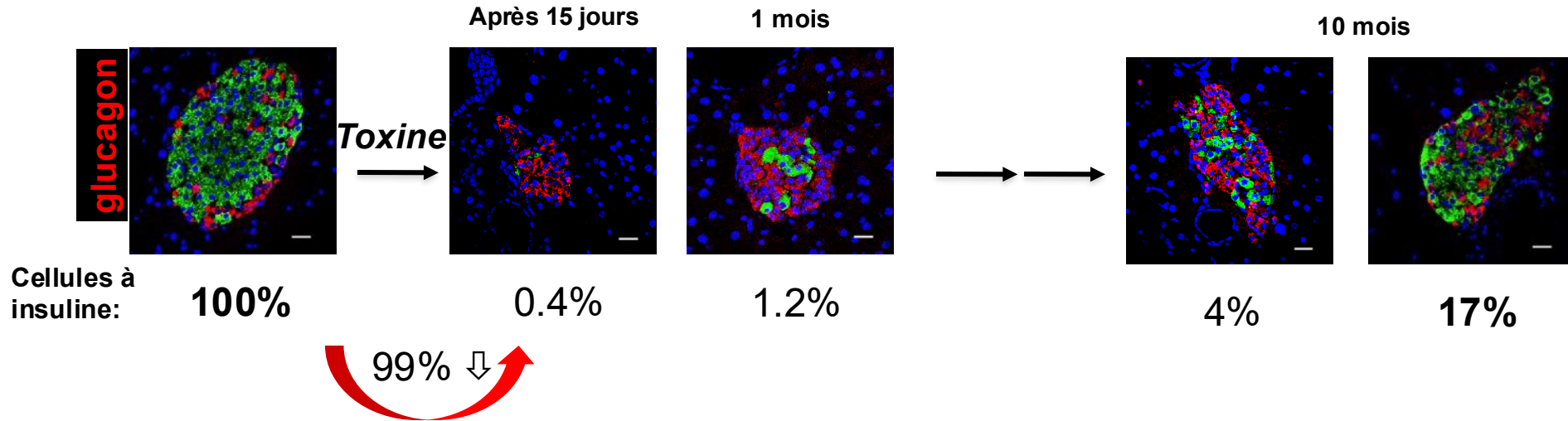
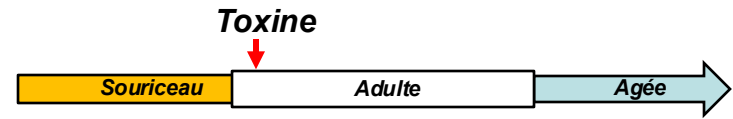


DIABETIQUE

Traitement: insuline



Destruction des cellules à insuline chez des souris adultes



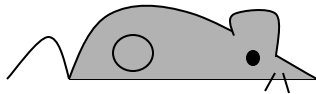
Réapparition progressive de nouvelles cellules à insuline au cours du temps

...mais régénération lente et partielle

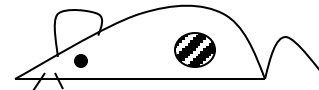
Quelle est l'origine
des nouvelles cellules à insuline?

souris transgéniques

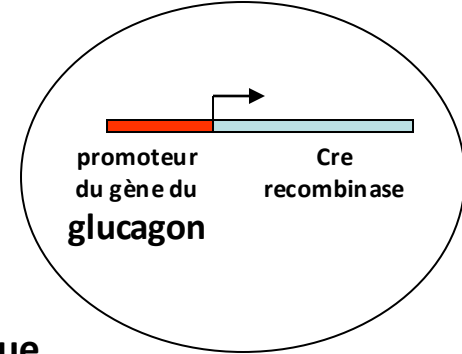
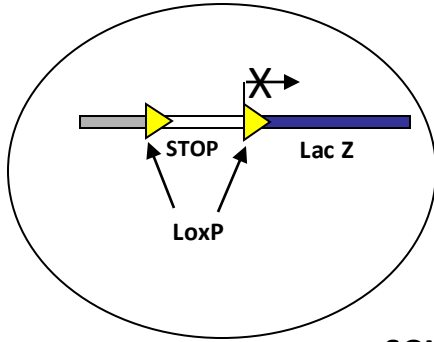
Rapporteur



Marqueur

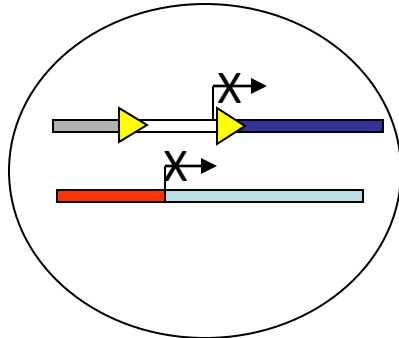
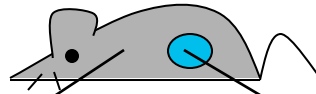


gène
« bleu »
inactif

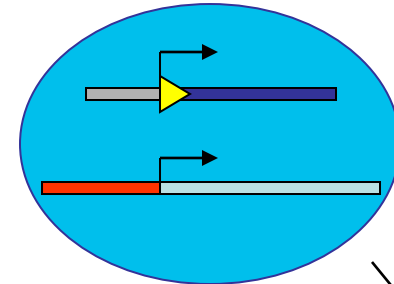


cellule α
(à glucagon)

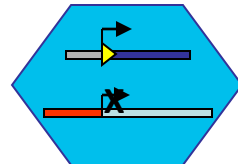
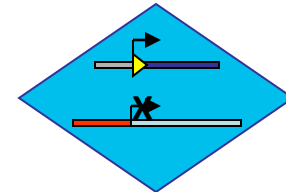
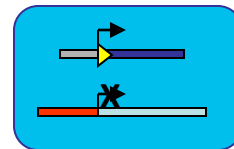
souris doublement transgénique



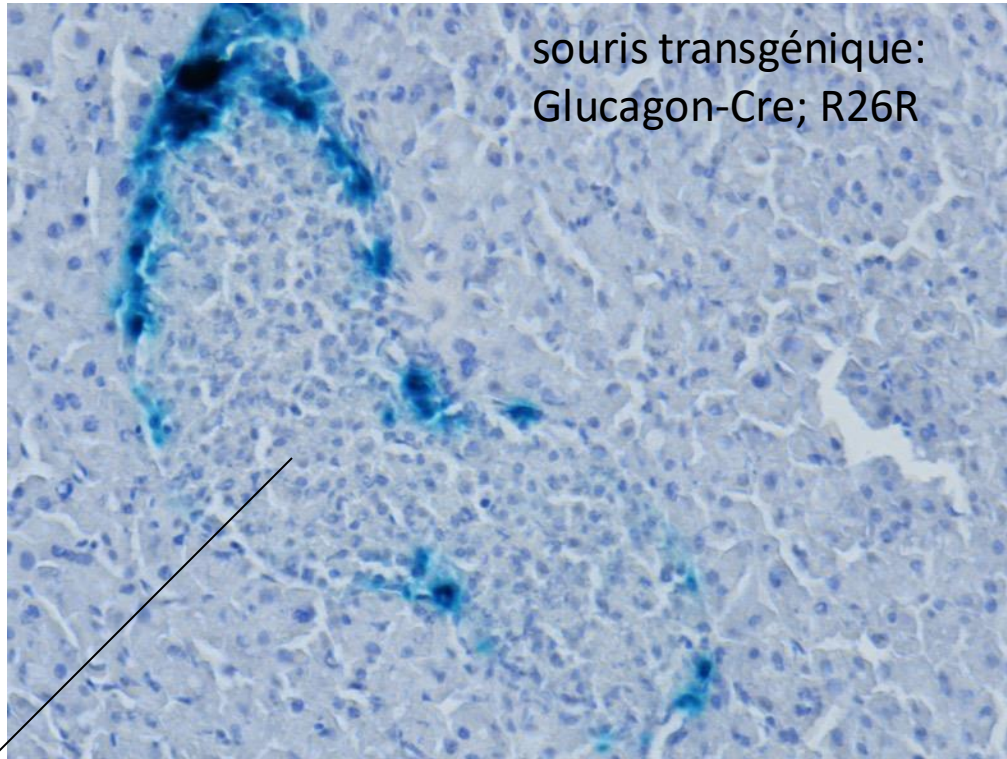
cellule α
(à glucagon):
gène
rapporteur
activé



Tous les descendants de la
cellule marquée sont marqués
aussi, de façon irréversible!

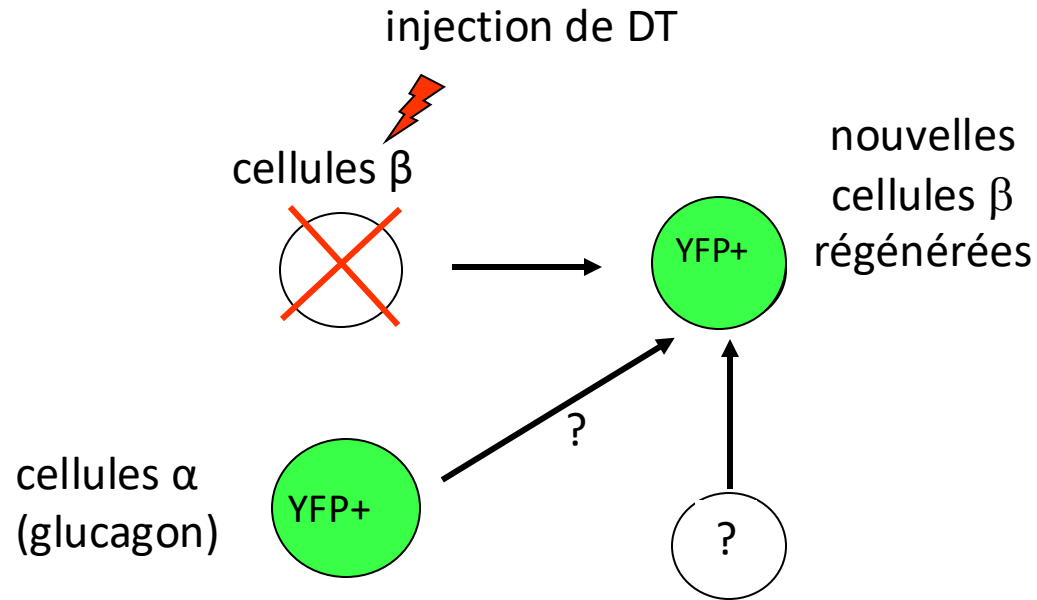


Les cellules α (à glucagon)
sont marquées irréversiblement (bleues)



Ilot de Langerhans (= îlot pancréatique)

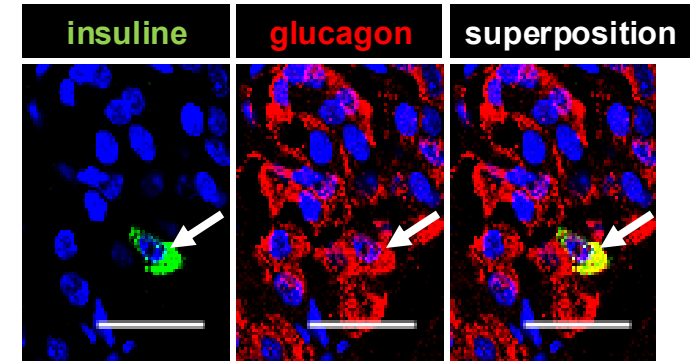
Marquage du lignage des cellules à glucagon et ses descendants



Origine des nouvelles cellules à insuline ?

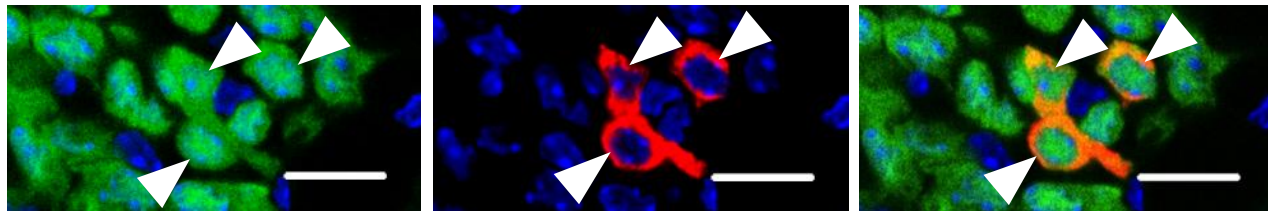
Rapidement après la destruction des cellules β :

Des cellules produisant simultanément de l'insuline et du glucagon



Nouvelles cellules à insuline

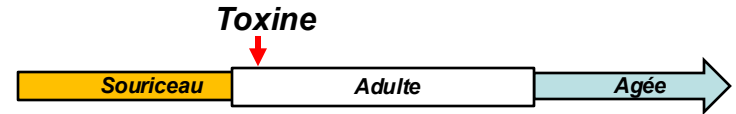
Traceur de cellules α



**Les nouvelles cellules à insuline
sont des cellules à glucagon (α) reprogrammées naturellement !**

Conclusion intermédiaire

Les cellules à glucagon (α) se convertissent en cellules à insuline
après l'élimination quasi-totale des cellules β chez les souris adultes



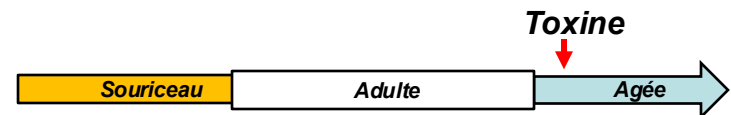
Cette régénération n'est **pas efficace**:

seulement 2% cellules à glucagon se convertissent

Une bonne nouvelle:

Capacité de régénération préservée dans le temps

Les cellules à glucagon se convertissent
aussi chez les souris âgées

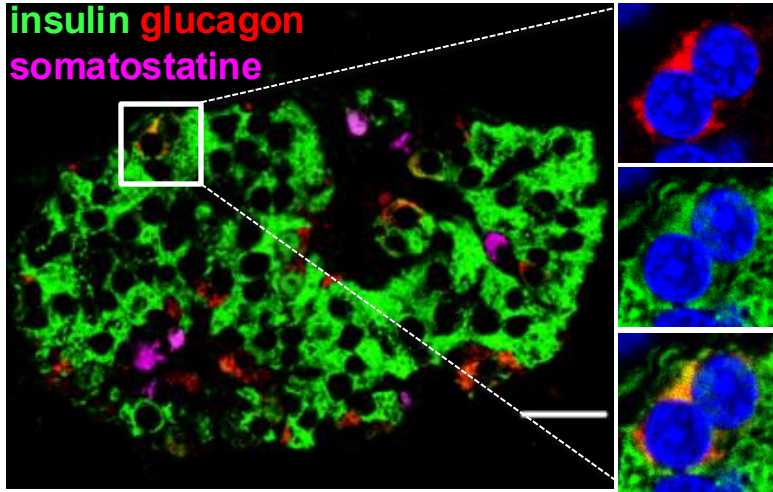


L'insuline agit elle-même comme un frein constitutif qui restreint la plasticité des cellules alpha.

Le maintien de l'identité cellulaire est un processus actif médié par des signaux répressifs qui refrèment une tendance naturelle des cellules à changer.

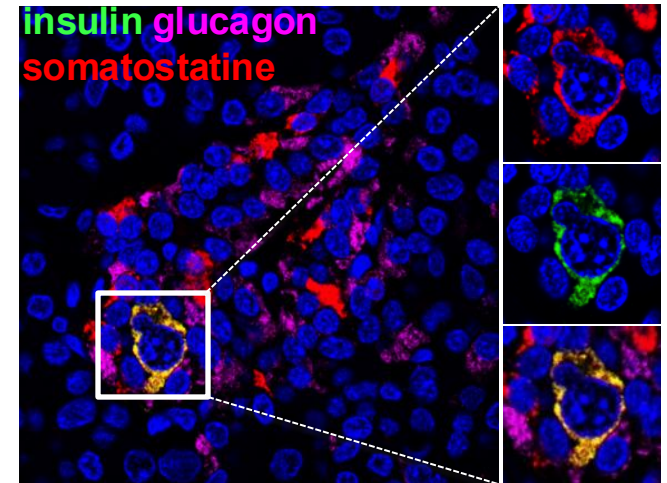
Qu'en est-il chez l'Homme?

❖ Îlot humain : **DIABETE type 2**



Cellules produisant de l'insuline et du glucagon

DIABETE type 1



Cellules produisant de l'insuline et la somatostatine

Pourrait suggérer que des cellules humaines α (glucagon) et δ (somatostatine) se convertissent en cellules à insuline dans le diabète de type 1 et 2

Observation surprenante:

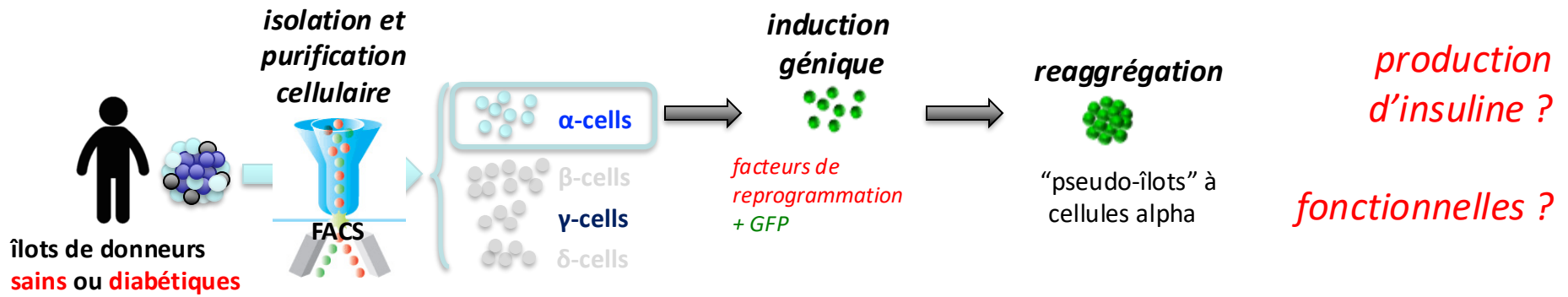
Ablation du pancréas chez enfants (si tumeurs) => diabétiques ... redeviennent souvent normo-glycémiques!

Régénération par conversion cellulaire ? à partir de cellules δ ? (analogie / jeunes souris)

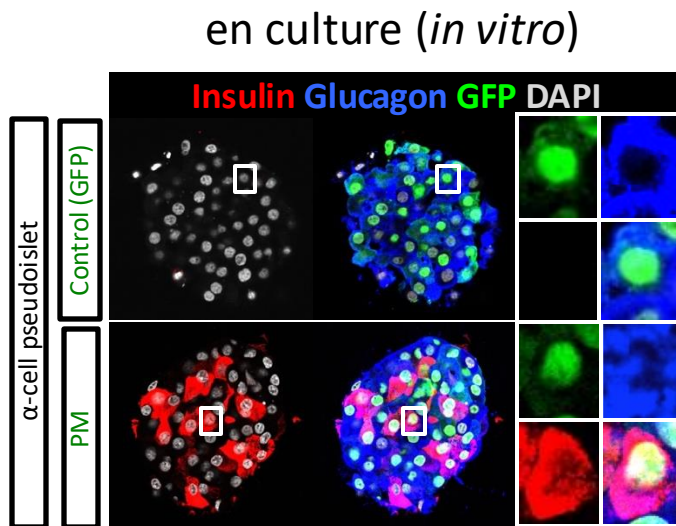
Qu'en est-il chez l'Homme?

Quelques rares cellules β persistent dans le pancréas de patients humains avec un diabète de type I depuis de nombreuses années:

- est-ce que ce sont des cellules β qui ont « échappé » au système immunitaire (auto-immunité) ?
- est-ce qu'il s'agit de cellules β nouvellement formées (c.-à-d. régénérées) ?

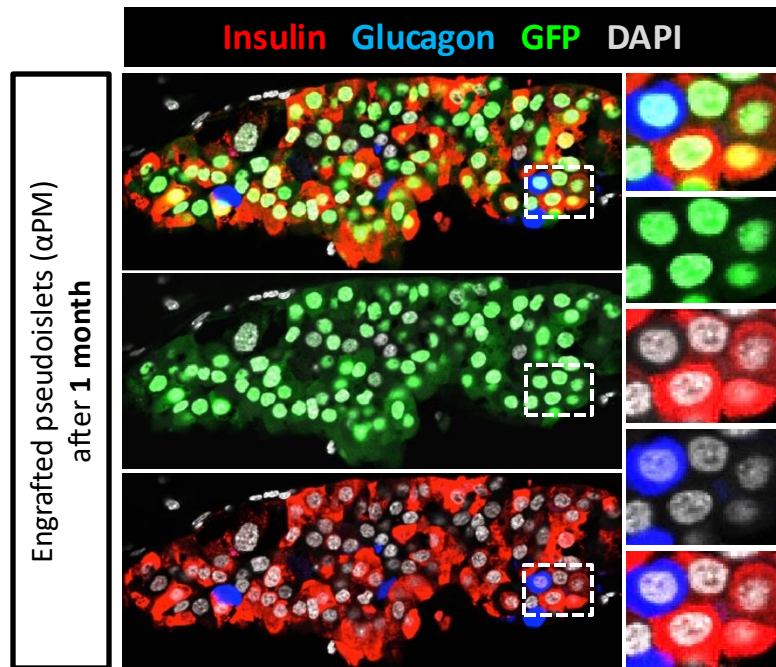


transplantation chez la souris (*in vivo*)



les cellules non-beta humaines reprogrammées secrètent de l'insuline en réponse au glucose

(DAPI: marqueur de l'ADN des noyaux)



les cellules non-beta humaines qui secrètent de l'insuline en réponse au glucose guérissent le diabète des souris transplantées

Régénération du Pancréas Adulte

Le pancréas adulte des mammifères a la capacité intrinsèque de régénérer des cellules à insuline nouvelles après leur perte totale.

Les cellules productrices de glucagon, de somatostatine et de polypeptide pancréatique (les cellules « non-beta ») peuvent, dans des conditions appropriées, se « reprogrammer » (convertir, « transdifférencier ») naturellement pour faire de l'insuline.



Plasticité Cellulaire

