

La *lettre* de la biomédecine

#N°3 – Mars 2024

Veille stratégique en santé

Les embryoides : Des modèles à la frontière des sciences et de l'éthique.

Revue de la littérature commentée

La lettre de la biomédecine

Veille stratégique en santé :

Est un bulletin périodique
réalisé par le Pôle
recherche, Europe,
internationale et veille de
la Direction générale
médicale et scientifique
de l'Agence de la
biomédecine.

Direction de l'édition

Marine Jeantet

Directrice générale, Agence de la biomédecine.

Michel Tsimaratos

Directeur général adjoint en charge des stratégies
médicales et scientifiques, Agence de la biomédecine.

Autrice

Laure Tabouy

Cheffe de projet recherche et neurosciences, Pôle
Recherche Europe international et veille, Agence de la
biomédecine.

Contributeurs

Jean-François Guerin

Éditorialiste

Président du conseil d'orientation de l'Agence de la
biomédecine.

Nicolas Rivron

Éditorialiste

Institut de biotechnologies moléculaire. Académie des
sciences autrichienne Vienne.

Samuel Arrabal

Comité éditorial

Responsable du Pôle Recherche Europe international
et veille, Agence de la biomédecine.

Hadhemi Kaddour Robin

Comité éditorial

Cheffe de projet recherche et neurosciences, Pôle
Recherche Europe international et veille, Agence de la
biomédecine.

Nicolas Chatauret

Comité éditorial

Chef de projet recherche, Pôle Recherche Europe
international et veille, Agence de la biomédecine.

Caroline Bogue

Bibliographie

Documentaliste, Pôle Recherche Europe international
et veille, Agence de la biomédecine.

Frédérique Barbut

Secrétaire de rédaction

Agence de la biomédecine.

Laure Desramé

Conception graphique et diffusion

Chargée de communication institutionnelle et relations
avec les publics, Agence de la biomédecine.

David Heard

Directeur de la Communication,

Agence de la biomédecine.

Sylviane Pint

Ancienne responsable du Pôle veille et ressources
documentaires, Agence de la biomédecine.

Chapitre 1

- Pourquoi des modèles d'embryons ?

PAGE 06

Chapitre 2

- Les modèles de développement embryonnaire ou « embryoïdes ».

PAGE 09

Chapitre 3

- État des réglementations et des réflexions éthiques.

PAGE 11

En bref

PAGE 15

Supplément 1

PAGE 16

Supplément 2

PAGE 18



**Jean-François
Guerin**

Professeur des
universités/praticien
hospitalier, Université Claude
Bernard Lyon, CHU de Lyon.
Président du conseil
d'orientation de l'Agence de la
biomédecine.

Le développement de la fécondation *in vitro* dans l'espèce humaine au début des années 1980 a rendu, pour la première fois dans l'histoire de l'humanité, l'embryon humain accessible aux embryologistes. Pendant longtemps l'embryon ne pouvait être cultivé au-delà d'une semaine, date à laquelle il s'extraît de sa zone pellucide et s'implante dans la muqueuse utérine. Cependant, en 2016, plusieurs équipes ont mis au point des dispositifs permettant de cultiver les embryons jusqu'aux jours 12-13, période à partir de laquelle ils se désorganisent. Les avancées technologiques dans ce domaine sont telles qu'on peut raisonnablement estimer que la culture pourra s'étendre au-delà de cette date dans un avenir proche. Aussi de nombreux pays ont défini une limite de 14 jours, sous la forme de recommandations ou d'une loi comme en France (loi de bioéthique du 2 août 2021).

Dans cette même période toute récente, des chercheurs ont développé des structures à partir de cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) et/ou de cellules dont on a induit la pluripotence (iPS), qui constituent des modèles embryonnaires, dont certains sont dits « intégrés », car ils peuvent former toutes les parties de l'embryon ainsi que ses annexes, dont le trophoctoderme, tissu précurseur du placenta. Ces modèles ont été développés chez la souris en 2019, et encore plus récemment chez l'Homme (depuis 2021). Ils n'ont pas encore acquis, dans le modèle murin, des propriétés leur permettant de mener une grossesse à terme, mais on peut penser, au vu des progrès technologiques spectaculaires réalisés au cours de ces dernières années, que cela sera possible dans un futur proche. Pour ce qui concerne l'espèce humaine, il existe un vide législatif qui s'explique par le fait que ces recherches sont très récentes. Plusieurs questions se posent néanmoins : les modèles embryonnaires, encore appelés « embryoïdes », peuvent-ils être assimilés à des embryons et être soumis aux mêmes règles, dont l'interdiction de les cultiver au-delà de 14 jours ? Et sinon, faut-il fixer une limite à leur développement *in vitro* ?

Le Conseil d'orientation¹ de l'agence de la biomédecine a souhaité définir un avis cadre reprenant l'ensemble des questions éthiques et scientifiques soulevées par ces modèles.

À la question « les embryoïdes peuvent-ils être considérés comme des embryons ? », le Conseil d'orientation a répondu par la négative, pour deux raisons principales : d'une part, ces modèles ne sont pas conçus à partir de l'union de 2 gamètes parentaux au cours du processus de fécondation – événement caractéristique de la reproduction sexuée, qui s'est progressivement mise en place il y a plusieurs centaines de millions d'années –, d'autre part, ils ne constituent pas le fruit d'un projet parental. Le Conseil d'orientation considère cependant les embryoïdes comme des modèles d'étude particulièrement précieux, qui permettent d'envisager de nombreuses applications biomédicales. Ces modèles, dans la mesure où ils sont fidèles, représentent une alternative intéressante, sur le plan éthique, à l'utilisation d'embryons humains à des fins de recherche.

Dans la mesure où ces modèles ne doivent pas être assimilés à des embryons, faut-il fixer des limites à leur durée de culture ? Le Conseil d'orientation propose d'autoriser les recherches sur ces embryoïdes jusqu'à un stade de développement équivalant au 28^{ème} jour du développement de l'embryon naturel, avec arrêt complet de toute expérimentation au-delà de ce stade. Cela permettrait d'explorer cette période du développement embryonnaire définie par les embryologistes comme une « boîte noire », s'étendant actuellement de la fin de la 2^{ème} semaine au début du 2^{ème} mois, date à partir de laquelle on dispose de modèles alternatifs. Le Conseil d'orientation n'est donc pas favorable à une poursuite de la culture des embryoïdes au-delà de 28 jours, et considère que les embryoïdes doivent être utilisés exclusivement pour des objectifs de recherche scientifique avec des critères de pertinence scientifique et une finalité médicale. Leur implantation *in vivo* doit demeurer proscrite dans l'espèce humaine, même si, dans un futur qu'on peut supposer proche, ils acquièrent des propriétés très voisines de celles des embryons. Afin de permettre des avancées scientifiques, tout en conservant un cadre éthique, le Conseil d'orientation propose au législateur de considérer la recherche sur ces modèles embryonnaires selon une troisième voie spécifique, entre celle concernant les CSEh et les cellules iPS, qui serait trop permissive, et celle concernant les embryons, qui serait trop contraignante.

> Notes

¹ Bruno C, Letur H, Lévy R, et al. Avis du Conseil d'orientation de l'Agence de la biomédecine : les modèles embryonnaires. [En ligne]. sept 2023. 11p. [Consulté le 5 février 2024].

Disponible: https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/2023-co-21_annexe_modeles_embryonnaires_vd28092023_.pdf



Nicolas Rivron

Biologiste du développement,
Institut de biotechnologie
moléculaire,
Académie des sciences
autrichiennes, Vienne.

Ces modèles deviendront-ils des embryons ?

Les scientifiques, dont le but est de faire des découvertes et de faire avancer les connaissances, se doivent d'essayer d'en mesurer les conséquences, intentionnelles ou non. La pleine liberté de chercher est essentielle, mais elle s'accompagne d'une responsabilité vis-à-vis de la société, dont l'exercice permet aux découvertes de s'intégrer, et aussi d'amener la société à évoluer.

Cela est d'autant plus important en embryologie humaine, un domaine portant une indéniable charge émotionnelle et éthique. Ces dernières années, des modèles d'embryons générés à partir de cellules souches ont été formés en laboratoire dans le but de faciliter l'étude de l'embryogenèse. Bien utilisés, ces modèles sont une alternative éthique et scientifique à l'utilisation d'embryons issus de fécondations in vitro (FIV) pour la recherche sur, par exemple, l'infertilité ou sur les pertes de grossesse précoces².

Cependant, ces modèles soulèvent aussi des questions. Quelle contribution réaliste peuvent-ils apporter ? Quel est leur statut juridique ? Seront-ils un jour utilisés pour la reproduction ?

Par le passé, des perceptions erronées de l'embryologie ont entravé les progrès, comme dans le cas de la FIV. Malgré les vives critiques envers ce que certains appelaient alors des « bébés éprouvette », les chercheurs ont persisté, et gagné l'acceptation du public.

Aujourd'hui, 5 % des bébés en Europe sont issus de FIV. Clairement, les conséquences des découvertes de la recherche doivent être discutées à un stade précoce, tout en gardant à l'esprit que l'éthique d'aujourd'hui n'est pas nécessairement celle de demain.

Les scientifiques ont fait preuve d'un engagement rapide et proactif sur les questions éthiques soulevées par ces nouveaux modèles. Ils ont engagé des discussions impliquant des éthiciens, des experts juridiques, et le public à travers des associations de patients.

Ces discussions ont permis de répondre aux premières préoccupations et ont débouché, en 2021, sur des lignes directrices internationales, éditées par l'International Society for Stem Cell Research (ISSCR) : les modèles doivent être utilisés avec prudence, après avoir obtenu une licence d'un comité d'éthique, et ne doivent pas être transférés dans un utérus.

En 2022, les discussions ont continué au niveau national, notamment au sein du Conseil d'orientation¹ de l'Agence de la biomédecine. Le Conseil a conclu que ces modèles ne peuvent pas être considérés comme des embryons car le cadre français tient compte de l'origine (fertilisation) et de l'intentionnalité (projet parental). N'étant pas des embryons, ces modèles sont jugés utiles, car ils permettent des recherches autrement irréalisables sur le premier mois de l'embryogenèse, la période la plus critique, et la moins connue. Si la qualité des modèles est suffisante, leur usage est justifié, mais seulement pour les 28 premiers jours, des alternatives étant possibles pour les périodes suivantes (par exemple les organoïdes).

Ce cadre permet d'envisager des avancées scientifiques et médicales, tout en établissant les garde-fous nécessaires, et en préservant la confiance du public.

Ces modèles deviendront-ils un jour des embryons ? Resteront-ils rudimentaires tout en aidant à faire avancer la médecine ? Personne ne le sait à ce jour, mais ces échanges permettent de tracer une route qui assure que les chercheurs travaillent dans des limites sociétales acceptables, et que ces limites sont vouées à évoluer avec le temps. Une telle approche, et une communication responsable, renforcent les bases de l'embryologie humaine, une étape cruciale pour permettre un impact positif sur notre société.

> Notes

² Shankar V, van Blitterswijk C, Vrij E, et al. From Snapshots to Development: Identifying the Gaps in the Development of Stem Cell-based Embryo Models along the Embryonic Timeline. Adv Sci Weinh Baden-Wurt Ger. avr 2021;8(8):19p.

Chez l'humain, les événements qui se produisent durant les premiers jours du développement embryonnaire sont aujourd'hui mal connus. Il s'agit d'étapes importantes puisque 60 % des échecs de grossesse interviennent dans les deux premières semaines suivant la fécondation³.

Une connaissance plus précise des stades les plus précoces du développement embryonnaire, permettrait d'améliorer la compréhension de nombreuses pathologies, d'anomalies du développement et de la survenue de fausses couches, et d'aboutir à la mise au point de traitements. Les recherches sur le développement précoce de l'embryon humain s'accompagnent de considérations éthiques qui impliquent un encadrement strict sur le plan légal, mais aussi la définition de limites précises⁴.

Afin de pouvoir étudier les premières étapes du développement sans avoir recours à des embryons humains, des équipes de recherche ont récemment développé des modèles d'étude à partir de cellules souches^{5,6,7} encore appelés « embryoides ». Ces derniers ont été mis au point pour mimer, de la façon la plus précise possible, certaines étapes du développement qui sont difficilement accessibles à la recherche. Il existe ainsi plusieurs types de MCDE, qui diffèrent selon la partie de l'embryon, et l'étape du développement qu'ils modélisent^{7,8}.

Si ces MCDE sont souvent présentés comme des alternatives à la recherche sur l'embryon humain, ils soulèvent néanmoins des questions éthiques qui font débat au sein de la communauté internationale. Chaque type de modèle soulève des questions spécifiques. En effet, si aucun de ces modèles n'est considéré aujourd'hui comme l'équivalent d'un embryon, il convient de s'interroger d'ores et déjà sur le statut à leur accorder, sur la façon d'encadrer les recherches et sur les limites à fixer.

Compte tenu des enjeux liés à ces modèles, dont la mise au point est récente et les évolutions constantes, il est apparu important d'y consacrer un numéro de la lettre de veille stratégique en santé de l'Agence de la biomédecine afin de détailler l'état des connaissances et des développements, les réflexions éthiques ainsi que les aspects réglementaires.

Chapitre 1

Pourquoi des modèles d'embryons

Une alternative à la recherche sur l'embryon humain

Étudier au plus près les événements qui se produisent au cours du développement embryonnaire précoce implique de mener des recherches sur des embryons humains. Ces embryons sont en général issus des tentatives de fécondations *in vitro*. Après la réalisation de leur projet parental, ou à l'arrêt de celui-ci, lorsqu'il reste des embryons congelés, ceux-ci peuvent être détruits, ou alors donnés à la recherche, selon le souhait des couples. Les détails du développement embryonnaire sont présentés « dans le supplément 1 *Le développement embryonnaire précoce* », à la fin de ce document (cf. focus « développement embryonnaire précoce »). La recherche sur ces embryons humains soulève des questions éthiques fondamentales, qui ont conduit certains pays à les interdire complètement. D'autres pays, dont la France, autorisent ces recherches uniquement au travers d'un encadrement strict⁹.

> Notes

3 Macklon NS, Geraedts JPM & Fauser BCJM. Conception to ongoing pregnancy: the « black box » of early pregnancy loss. Hum Reprod Update. juil-août 2002;8(4):333-343.

4 George R & Tollefsen C. Embryo Research Ethics. In: Zima T, Weisstub DN, éditeurs. Medical Research Ethics: Challenges in the 21st Century. Philosophy and Medicine; vol. 172. Springer Verlag; 2022. p. 3-15.

5 Burgaud M, Bretin B, Reignier A et al. Du nouveau dans les modèles d'étude de l'embryon humain. Médecine/Sciences. févr 2023;39(2):9p

6 Luijckx D, Shankar V, van Blitterswijk C, et al. From Mice to Men: Generation of Human Blastocyst-Like Structures In Vitro. Front Cell Dev Biol. mars 2022;10:21p.

7 Rossant J. Why study human embryo development? Dev Biol. 5 févr 2024;509:43-50.

8 Matthews KR & Morali D. National human embryo and embryoid research policies: a survey of 22 top research-intensive countries. Regen Med. juill 2020;15(7):1905-1917.

9 Matthews KR & Morali D. National human embryo and embryoid research policies: a survey of 22 top research-intensive countries. Regen Med. juill 2020;15(7):1905-1917.

C'est le respect, dû à l'embryon humain, qui définit la limite dans le cadre de la recherche. Les modèles animaux, bien qu'ils permettent d'apporter des connaissances importantes, présentent une pertinence limitée. Aucun d'eux, par essence, n'est capable de reproduire avec exactitude le développement embryonnaire humain^{10,11}. Le développement de modèles alternatifs apparaît donc indispensable.

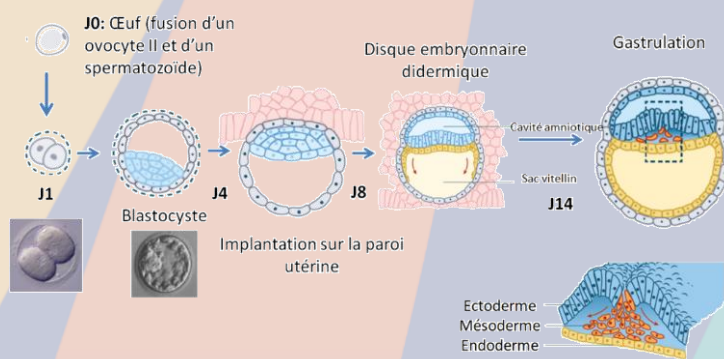
Pour mettre au point des modèles qui s'approchent au plus près de l'embryon humain, les équipes de recherche disposent de lignées de cellules souches d'origine embryonnaire, ainsi que de lignées de cellules souches prélevées chez des adultes, et génétiquement reprogrammées à l'état embryonnaire. Plus d'informations concernant les cellules souches sont présentées « dans le supplément 2 Les cellules souches ». Le développement récent de techniques permettant de cultiver ces cellules en trois dimensions, ouvre la possibilité de les utiliser pour reproduire *in vitro* certaines étapes clés du développement embryonnaire.

Le développement embryonnaire précoce

La fécondation de l'ovule par le spermatozoïde marque le début du développement embryonnaire. Il en résulte une cellule unique appelée zygote. Le zygote migre ensuite le long de la trompe de Fallope vers la cavité utérine. Cette étape de migration s'accompagne d'une série de divisions successives. Il atteint la paroi de l'utérus le 7^{ème} jour après la fécondation, où il s'implante progressivement. Entre le 4^{ème} et le 7^{ème} jour, l'embryon est à un stade appelé « blastocyste » et il est composé d'environ 200 cellules.

La phase de nidation, ou implantation de l'embryon dans l'endomètre, s'achève le 14^{ème} jour suivant la fécondation. À ce stade, l'embryon se présente comme un disque cylindrique composé de deux couches cellulaires (disque didermique) et de ses annexes (dont la cavité amniotique et le sac vitellin).

Au 15^{ème} jour environ, débute la phase dite de gastrulation, qui marque la première différenciation des cellules de l'embryon en trois feuillets : ectoderme, mésoderme et endoderme.



Les limites de la recherche sur l'embryon

La règle des 14 jours

La question de la limite de durée de culture d'un embryon humain s'est posée dès la mise au point des techniques de fécondation *in vitro*. Le consensus international actuel fixant la limite de durée de culture de l'embryon humain à 14 jours après la fécondation, coïncide avec l'apparition d'une structure appelée « ligne primitive » (cf. focus « développement embryonnaire précoce »). Cette limite a été largement adoptée, et certains pays l'ont intégrée dans la loi, comme la France en 2021^{9,12}. La définition de cette limite repose sur deux considérations¹³ :

> Notes

10 Carter AM. Animal models of human pregnancy and placentation: alternatives to the mouse. *Reprod Camb Engl*. déc 2020;160(6):129-143.

11 Duranthon V. La période préimplantatoire du développement des mammifères: la souris est-elle un bon modèle ? *Bull Académie Vét Fr*. juin 2019;172(1):77-82.

12 Fabbri M, Ginoza M, Assen L, et al. Modeling policy development: examining national governance of stem cell-based embryo models. *Regen Med*. févr 2023;18(2):155-168.

13 Warnock M. Report of the committee of inquiry into human fertilisation and embryology. *Ir Nurs News*. 1985;5(3):7-8.

⇒ l'apparition de la ligne primitive coïncide avec la première différenciation des cellules de l'embryon. C'est à partir du 14^{ème} jour que démarre la neurogenèse, qui aboutira à la formation des neurones du système nerveux central. Avant ce 14^{ème} jour, le fait que l'embryon soit dépourvu de neurones ou de précurseurs neuronaux, apporte la certitude qu'il est incapable d'un ressenti, notamment pour ce qui concerne la douleur, ou d'avoir conscience de son environnement ;

⇒ lorsque la ligne primitive est formée, l'embryon perd sa capacité de se scinder en deux jumeaux homozygotes. Il s'agit donc d'une limite à partir de laquelle l'embryon « s'individualise » et devient unique.

Cette limite est reconnue par l'ensemble de la communauté scientifique, y compris dans les pays qui ne l'ont pas intégrée dans la loi. Ainsi, bien qu'il soit techniquement possible de dépasser cette limite, aucune équipe au monde n'a tenté de cultiver l'embryon humain au-delà du 13^{ème} jour de développement.

La boîte noire

La limite de 14 jours définie pour la culture de l'embryon humain marque le début d'une période du développement embryonnaire que la communauté scientifique qualifie de « boîte noire »¹⁴. En effet, au-delà du 14^{ème} jour, aucune recherche n'est possible sur un embryon issu de fécondation *in vitro*. Les recherches peuvent être menées sur des embryons issus d'interruption de grossesse, mais il n'est pas possible, sauf cas très exceptionnel, d'étudier de tels embryons avant la fin de la quatrième semaine de développement, soit au 28^{ème} jour.

La boîte noire dure du 14^{ème} au 28^{ème} jour. Cette période est pourtant cruciale. Elle comprend les étapes clés du développement de l'embryon : la gastrulation, puis la neurulation. C'est au cours de la gastrulation qu'apparaissent la majorité des anomalies cellulaires et des malformations qui entraînent une fausse-couche^{3,15} (cf. Focus « la collection Carnegie »). Le développement de modèles permettant d'accéder aux événements cellulaires et moléculaires de cette période est essentiel à la compréhension de ces phénomènes, et à la possibilité de mettre au point des traitements.

La collection Carnegie

La plupart de nos connaissances sur le développement embryonnaire humain, ainsi que sur les pathologies du développement, reposent sur l'observation d'embryons issus d'avortements spontanés. Ces embryons sont réunis sous forme de collections historiques, constituées au siècle dernier. Il en existe plusieurs à travers le monde, dont la plus célèbre et la plus complète est la collection Carnegie, constituée entre la fin du XIX^{ème} siècle et le début des années cinquante aux États-Unis, et aujourd'hui hébergée au *National Museum of Health and Medicine* à Washington.

La collection Carnegie réunit des embryons depuis le premier jour après la fécondation jusqu'au début de la huitième semaine, qui marque le début de la vie fœtale. Une part importante de ces embryons a été obtenue par prélèvement sur des utérus issus d'hystérectomie, dans des conditions qui seraient aujourd'hui éthiquement inacceptables. Les embryons ont été classés en stades numérotés de 1 à 23 selon leur évolution. Aujourd'hui, la classification des embryons en « stades Carnegie » est toujours utilisée.



> Notes

14 Hurlbut JB, Hyun I, Levine AD, et al. Revisiting the Warnock rule. *Nat Biotechnol.* 9 nov 2017;35(11):1029-1042.

15 O'Rahilly R & Müller F. Developmental stages in human embryos: revised and new measurements. *Cells Tissues Organs.* févr 2010;192(2):73-84.

Chapitre 2

• Les modèles de développement embryonnaire ou « embryoides »

Comment ces modèles sont-ils constitués ?

Les modèles cellulaires de développement embryonnaires (MCDE) ont été mis au point pour étudier le développement embryonnaire précoce sans avoir recours à des embryons humains. Ils permettent d'étudier la période de la « boîte noire », jusqu'alors inaccessible à la recherche. Ces modèles sont générés à partir de cellules souches « pluripotentes », qui présentent les caractéristiques cellulaires entre le 5^{ème} et le 14^{ème} jour du développement embryonnaire (cf. Focus « cellules souches embryonnaires humaines et cellules souches pluripotentes induites »).

Deux types cellulaires peuvent être à l'origine des MCDE, les CSEh et les cellules induites à la pluripotence¹⁶. Lorsqu'elles sont mises en culture dans des conditions permettant leur agrégation, ces cellules sont capables d'interagir entre elles, de s'organiser dans l'espace, de reproduire spontanément la structure tridimensionnelle d'un embryon, ainsi que des événements qui se produisent durant les étapes successives du développement embryonnaire^{6,8}.



Cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) et cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Depuis 1998, la recherche sur l'embryon a permis de dériver des lignées CSEh. Ces lignées sont obtenues par prélèvement d'un de cellules d'un embryon humain issu de fécondation *in vitro*, puis mises en culture. Ces cellules ont la capacité de se multiplier indéfiniment et de pouvoir se différencier dans tous les types cellulaires d'un individu constitué.

En 2006, le Pr. Shinya Yamanaka (prix Nobel de médecine en 2012) a développé des cellules souches dites « induites à la pluripotence », ou iPS. Il s'agit de cellules différenciées de tissu mature, comme la peau, prélevées chez une personne adulte, puis reprogrammées génétiquement pour les ramener à un état équivalent aux cellules souches embryonnaires.

Il existe différents types de modèles en fonction de leur degré de complétude et de l'étape du développement qu'ils modélisent (cf. Supplément 1 « développement embryonnaire précoce ») :

Les modèles incomplets ou « non intégrés »

Ils sont composés d'une partie des structures embryonnaires au stade du développement étudié, mais pas de la totalité. En particulier, les structures à l'origine des annexes embryonnaires, dont le placenta, (cf. Supplément 1 « développement embryonnaire précoce ») sont généralement absentes. Par conséquent, bien que ces modèles soient particulièrement adaptés pour étudier certaines structures durant une période donnée, ils sont intrinsèquement incapables de reproduire l'intégralité du développement embryonnaire. Cette catégorie inclut notamment les premiers modèles mis au point, appelés « gastruloïdes » car ils miment les événements qui se produisent durant l'étape de gastrulation, et qui sont dépourvus des annexes

> Notes

16 Liu G, David BT, Trawczynski M & Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. Stem Cell Rev Rep. févr 2020;16(1):3-32.

embryonnaires et de la partie neuro-antérieure de l'embryon^{17,18} (cf. Supplément 1 « développement embryonnaire précoce »).

Les modèles complets ou « intégrés »

Ces modèles contiennent la totalité des structures embryonnaires, y compris les annexes, au stade du développement étudié. Ils sont donc particulièrement pertinents pour observer les interactions entre cellules et les événements qui se déroulent au stade étudié. Ils comprennent notamment les « blastoïdes », qui miment le stade blastocyste, équivalent au 5^{ème} jour de développement de l'embryon naturel (cf. Supplément 1 « développement embryonnaire précoce »). Ils sont particulièrement adaptés pour étudier les événements qui se produisent durant la période qui encadre l'implantation de l'embryon^{19,20,21,22,23}. À noter qu'en l'absence de consensus sur les MCDE, aucune équipe de recherche n'a cultivé les modèles intégrés humains au-delà d'un stade équivalent au 14^{ème} jour de développement chez l'embryon naturel, à l'exception de trois équipes, aux États-Unis et en Chine, qui ont eu une autorisation spécifique de leur comité d'éthique local, sans jamais dépasser 21 jours^{24,25,26}.

Leur intérêt pour la recherche et leurs applications possibles

Les MCDE offrent de nombreuses perspectives, à la fois en recherche fondamentale et appliquée. Les techniques les plus récentes permettent de générer simultanément un nombre important de MCDE génétiquement identiques, ce qui garantit la significativité des résultats observés. Parmi les finalités des recherches impliquant les MCDE, il convient de distinguer²⁷ :

⇒ l'étude du développement embryonnaire précoce chez l'humain et plus particulièrement : (i) la période allant du 7^{ème} au 14^{ème} jour, correspondant à la phase d'implantation de l'embryon dont les défauts peuvent conduire à des fausses couches à répétition ; et (ii) la période allant du 14^{ème} au 28^{ème} jour, considérée comme une « boîte noire »^{28,29} ;

⇒ la possibilité de réaliser du criblage de molécules à grande échelle dans un but thérapeutique : il s'agit de tester un grand nombre de molécules biologiquement actives pour évaluer leur action ou toxicité sur des MCDE en culture. Pour des raisons éthiques, ce type d'approche n'est pas envisageable sur l'embryon naturel^{30,31} ;

> Notes

17 Moris N, Anlas K, van den Brink SC, et al. An in vitro model of early anteroposterior organization during human development. *Nature*. juin 2020;582(7812):410-415.

18 Ghimire S, Mantziou V, Moris N, et al. Human gastrulation: The embryo and its models. *Dev Biol*. juin 2021;474:100-108.

19 Kagawa H, Javali A, Khoei HH, et al. Human blastoids model blastocyst development and implantation. *Nature*. janv 2022;601(7894):600-605.

20 Liu X, Tan JP, Schröder J, et al. Modelling human blastocysts by reprogramming fibroblasts into iBlastoids. *Nature*. mars 2021;591(7851):627-632.

21 Sozen B, Jorgensen V, Weatherbee BAT, et al. Reconstructing aspects of human embryogenesis with pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 21 sept 2021;12(1):13p.

22 Yu L, Wei Y, Duan J, et al. Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. *Nature*. mars 2021;591(7851):620-626.

23 Yanagida A, Spindlow D, Nichols J, et al. Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation. *Cell Stem Cell*. 3 juin 2021;28(6):1016-1022.

24 De Santis R, Rice E, Croft G, et al. The emergence of human gastrulation upon in vitro attachment. *Stem Cell Rep*. 9 janv 2024;19(1):41-53.

25 Guo M, Wu J, Chen C, et al. Self-renewing human naïve pluripotent stem cells dedifferentiate in 3D culture and form blastoids spontaneously. *Nat Commun*. 22 janv 2024;15(1):18p.

26 Karvas RM, Zemke JE, Ali SS, et al. 3D-cultured blastoids model human embryogenesis from pre-implantation to early gastrulation stages. *Cell Stem Cell*. 7 sept 2023;30(9):1148-1165.

27 Moris N, Alev C, Pera M, et al. Biomedical and societal impacts of in vitro embryo models of mammalian development. *Stem Cell Rep*. 11 mai 2021;16(5):1021-1030.

28 David L, Bruneau A, Fréour T, et al. An update on human pre- and peri-implantation development: a blueprint for blastoids. *Curr Opin Genet Dev*. déc 2023;83.

29 Taniguchi K, Heemskerk I & Gumucio DL. Opening the black box: Stem cell-based modeling of human post-implantation development. *J Cell Biol*. 4 févr 2019;218(2):410-421.

30 Amel A, Rossouw S & Goolam M. Gastruloids: A Novel System for Disease Modelling and Drug Testing. *Stem Cell Rev Rep*. janv 2023;19(1):104-113.

31 Niethammer M, Burgdorf T, Wistorf E, et al. In vitro models of human development and their potential application in developmental toxicity testing. *Dev Camb Engl*. 15 oct 2022;149(20):6p.

⇒ la différenciation de cellules potentiellement utilisables en thérapie cellulaire. L'objectif est ici d'utiliser les MCDE comme sources de cellules qui sont habituellement difficiles à obtenir ou à différencier *in vitro*³².

Les MCDE ne sont pas des embryons.

Bien qu'ils soient capables de reproduire certaines étapes du développement embryonnaire, la communauté scientifique est unanime pour considérer que les MCDE ne sont pas équivalents à l'embryon naturel, même lorsque l'on considère les modèles « intégrés ». Deux arguments permettent de soutenir cette conclusion :

- ⇒ les modèles embryonnaires obtenus chez l'animal sont incapables, après transfert chez la femelle, de reconstituer la totalité du développement et de donner naissance à un nouveau-né^{33,34} ;
- ⇒ l'analyse transcriptomique des MCDE, quel que soit le modèle considéré, montre la présence de cellules non attendues au stade étudié, car trop ou pas assez différenciées^{35,36}.

Ces arguments sont valables aujourd'hui. Il est vraisemblable que les techniques évoluent et s'améliorent à l'avenir, conduisant à des modèles de plus en plus proches de l'embryon naturel. La question de l'équivalence est donc centrale. Il convient d'ores et déjà de s'interroger sur les « points de bascule », qui sont à définir, à partir desquels les MCDE pourraient être considérés comme équivalents de l'embryon naturel. Cette question fait débat actuellement dans la communauté scientifique, sans qu'un consensus n'émerge. Les différentes hypothèses seront présentées dans le chapitre 3.

Chapitre 3

État des réglementations et des réflexions éthiques.

État des réglementations

À ce jour, la France est le seul pays à avoir adopté un texte de loi spécifique concernant la recherche sur les MCDE. La loi de bioéthique du 2 août 2021 prévoit une disposition concernant les recherches sur les CSEh et les iPS ayant pour finalité « l'obtention de modèles de développement embryonnaire *in vitro* ». Ces recherches sont soumises à déclaration auprès de l'Agence de la biomédecine, qui saisit obligatoirement son Conseil d'orientation¹ pour avis.

Un seul pays, l'Australie, a pris officiellement position, dans un communiqué de presse, sur l'encadrement de ces recherches. Le 18 mars 2021, le Conseil national de la santé et de la recherche médicale australien a déclaré que les recherches sur les blastoïdes étaient assimilées à la recherche sur l'embryon. L'équipe de José Polo, qui a publié le premier modèle de blastoïde humain en 2021, a donc sollicité et obtenu une autorisation de recherche sur l'embryon²¹.

Dans tous les autres pays dans lesquels des modèles MCDE ont été développés, c'est la réglementation sur les cellules souches qui a été appliquée. C'est notamment le cas en Italie, où la recherche sur l'embryon est

> Notes

32 Gupta A, Lutolf MP, Hughes AJ, et al. Bioengineering in vitro models of embryonic development. *Stem Cell Rep.* 11 mai 2021;16(5):1104-1116.

33 Rivron NC, Frias-Aldeguer J, Vrij EJ, et al. Blastocyst-like structures generated solely from stem cells. *Nature.* mai 2018;557(7703):106-111.

34 Li J, Zhu Q, Cao J, et al. Cynomolgus monkey embryo model captures gastrulation and early pregnancy. *Cell Stem Cell.* 6 avr 2023;30(4):362-377.

35 Zhao C, Reyes AP, Schell JP, et al. A Comprehensive Human Embryogenesis Reference Tool using Single-Cell RNA-Sequencing Data. [En ligne]. 2 févr 2024. 62p. [Consulté le 5 février 2024]. Disponible : <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.05.07.442980v4>

36 Zheng Y, Yan RZ, Sun S, et al. Single-cell analysis of embryoids reveals lineage diversification roadmaps of early human development. *Cell Stem Cell.* 1er sept 2022;29(9):1402-1419.

interdite par la loi et où une équipe de l'école vétérinaire de Milan a développé un modèle de type blastoïde à partir d'IPS humaines³⁷.

Les questions éthiques soulevées par les MCDE

Nous l'avons vu, les MCDE ne sont pas équivalents à l'embryon naturel. Toutefois, ils sont capables de reproduire très précisément certaines étapes du développement embryonnaire *in vitro*. Les évolutions constantes des techniques laissent penser qu'une équivalence pourrait un jour être envisagée. Les MCDE soulèvent donc des questions éthiques spécifiques :

La distinction entre modèles intégrés et non intégrés

Les modèles intégrés miment au plus près le développement de l'embryon naturel. Chez l'animal, ces modèles ont été utilisés dans des expériences de transfert, sans qu'aucune naissance n'ait été obtenue à ce jour. Il est possible d'envisager qu'à l'avenir ces modèles atteignent l'équivalence avec l'embryon naturel.

À l'inverse, les modèles non intégrés ne seront jamais en mesure de reproduire la totalité du développement embryonnaire. Ils ne seront donc jamais équivalents à l'embryon naturel.

Sur le plan éthique, ces deux modèles peuvent donc être distingués, par leur capacité d'atteindre un jour l'équivalence avec l'embryon naturel.

Le statut des MCDE

Les MCDE sont générés à partir de cellules souches et modélisent le développement embryonnaire. Ils ne peuvent donc être considérés ni tout à fait comme des cellules en culture, ni complètement comme des embryons. Dès lors, il convient de s'interroger sur leur statut et sur leur encadrement réglementaire. Trois grandes tendances sont observées :

- ⇒ le statut des MCDE doit d'ores et déjà être considéré comme identique à celui de l'embryon naturel. La recherche sur les MCDE devrait donc être encadrée comme la recherche sur l'embryon ;
- ⇒ les MCDE ont un statut spécifique différent de l'embryon naturel. Un encadrement spécifique de la recherche devrait donc être créé, incluant une revue par un comité d'éthique et la définition d'un délai de culture à ne pas dépasser ;
- ⇒ les MCDE sont des agrégats de cellules qui s'auto-organisent. En conséquence, il convient de leur appliquer le même cadre qu'à la recherche sur les cellules souches.

L'équivalence avec l'embryon naturel

Comme mentionné dans les paragraphes précédents, les MCDE ne sont pas considérés comme équivalents à l'embryon naturel, mais les évolutions des technologies devraient les en rapprocher de plus en plus. Dès lors il convient de définir des « points de bascule » à partir desquels l'équivalence pourrait être constatée et considérée comme acquise. Trois critères sont actuellement proposés³⁸.

- 1) L'obtention de naissances chez l'animal serait la démonstration formelle que les MCDE sont capables de reproduire l'ensemble du développement embryonnaire chez l'espèce étudiée. L'équivalence avec l'embryon naturel serait donc acquise chez cette espèce. Il conviendrait alors de s'interroger sur la pertinence et la représentativité du modèle animal par rapport à l'embryon humain. L'obtention de naissances à partir de MCDE chez la souris suffirait-elle à établir l'équivalence chez l'être humain ? Ou faudrait-il observer des naissances chez des espèces phylogénétiquement plus proches, comme le primate non humain (singes et grands singes) ?

> Notes

37 Pennarossa G, Arcuri S, De Iorio T, et al. Combination of epigenetic erasing and mechanical cues to generate human epiBlastoids from adult dermal fibroblasts. *J Assist Reprod Genet.* mai 2023;40(5):1015-1027.

38 Rivron NC, Martinez Arias A, Pera MF, et al. An ethical framework for human embryology with embryo models. *Cell.* 17 août 2023;186(17):3548-3557.

- 2) Le critère de ressemblance morphologique entre MCDE et embryon naturel est à prendre en compte. En effet, s'il devenait impossible de distinguer l'un de l'autre sous microscope, y compris pour un médecin biologiste ou un embryologiste, même après des marquages spécifiques de certains types cellulaires, l'équivalence pourrait être envisagée. La question du stade auquel cette équivalence est observée est néanmoins à considérer. Une ressemblance au 5^{ème} jour est-elle suffisante pour établir l'équivalence ? Faut-il attendre le 14^{ème} jour ? ou au-delà (21^{ème}, 28^{ème}, 50^{ème} jour) ?
- 3) La composition cellulaire analysée par les techniques actuelles de séquençage permettent de définir un profil « transcriptomique » de l'embryon, cellule par cellule, pour un stade donné. La comparaison de ces profils entre un embryon naturel et un MCDE, permet d'évaluer si la composition cellulaire des deux entités est équivalente. À ce jour des différences notables ont été observées, quels que soient les modèles étudiés. Si des profils identiques étaient obtenus, l'équivalence entre MCDE et embryon naturel pourrait être proposée. Comme pour le point précédent, il conviendrait de s'interroger sur le stade auquel l'équivalence des profils est observée : 5^{ème} jour ? 14^{ème} jour, 21^{ème} jour ou au-delà (21^{ème}, 28^{ème}, 50^{ème} jour) ?

Quelles limites pour la recherche sur les MCDE ?

La principale limite, sur laquelle l'ensemble de la communauté scientifique et des instances éthiques s'accordent, concerne l'interdiction formelle de transférer des MCDE humains à des fins de gestation. Il existe un consensus unanime pour que les modèles humains soient limités à une finalité de recherche, et ne soient manipulés qu'*in vitro*. Le transfert dans un utérus humain ou animal doit être interdit.

Une autre limite actuellement en discussion concerne la définition d'une durée de culture pour les modèles de développement embryonnaires chez l'humain. Comme il s'agit de modèles expérimentaux, la question qui se pose est celle de la durée. Doit-on appliquer la même limite que pour l'embryon naturel, ou autoriser une culture prolongée ? Selon la littérature, les différentes positions sont les suivantes³⁹ :

- ⇒ ne pas créer de distinction avec l'embryon naturel et appliquer la limite de 14 jours ;
- ⇒ repousser progressivement cette limite chez les MCDE : 16 jours, puis 18 jours, etc. en évaluant au fur et à mesure l'impact des nouvelles connaissances générées ;
- ⇒ autoriser la culture des MCDE jusqu'à 21 jours, ce qui permettrait d'étudier la phase de gastrulation ;
- ⇒ autoriser la culture des MCDE jusqu'à 28 jours, ce qui permettrait d'étudier l'ensemble des événements qui se produisent durant la période de la « boîte noire » ;
- ⇒ autoriser la culture des MCDE jusqu'à 50 jours, ce qui permettrait d'étudier l'ensemble du développement embryonnaire, de la fécondation jusqu'à la fin de la 8^{ème} semaine qui coïncide avec le début de la vie fœtale.

Le chemin de la communauté scientifique

Les premiers articles sur les considérations éthiques liées aux recherches sur les MCDE sont venus de la communauté scientifique dès 2015⁴⁰. En 2018, suite à la description des premiers modèles intégrés de type blastoïde chez la souris, les principales équipes impliquées dans le développement de ces modèles ont co-signé un article faisant état des principales questions éthiques soulevées par ces modèles⁴¹. Pour la communauté scientifique, il était important que les réflexions soient menées en même temps que les développements dans un domaine nouveau en pleine expansion. Des publications plus récentes rapportent des réflexions actualisées proposant notamment une terminologie actualisée et des « points de bascule » pour évaluer l'équivalence MCDE-embryon³⁹.

> Notes

39 Illtis AS, Koster G, Reeves E, et al. Ethical, legal, regulatory, and policy issues concerning embryoids: a systematic review of the literature. Stem Cell Res Ther. 21 août 2023;14(1):15p.

40 Pera MF, de Wert G, Dondorp W, et al. What if stem cells turn into embryos in a dish? Nat Methods. oct 2015;12(10):917-919.

41 Rivron N, Pera M, Rossant J, et al. Debate ethics of embryo models from stem cells. Nature. déc 2018;564(7735):183-185.

La société internationale de recherche sur les cellules souches (*International Society for Stem Cell Research* – ISSCR) a été la première à émettre des recommandations sur les modèles de développement embryonnaire⁴². Cette société savante, composée de chercheurs dans le domaine des cellules souches, publie depuis 2006 des recommandations éthiques régulièrement mises à jour concernant les recherches impliquant les cellules souches humaines et l'embryon humain.

L'ensemble de la communauté scientifique applique ces recommandations, qui sont également suivies par les éditeurs de revues scientifiques. Il est actuellement impossible de publier des travaux de recherche dans une revue majeure sans avoir respecté les recommandations de l'ISSCR.

Les recommandations de l'ISSCR définissent trois catégories de recherche :

Catégorie 1 : Recherches ne nécessitant pas obligatoirement un processus de surveillance scientifique et éthique spécialisé au-delà des comités d'éthiques internes aux instituts de recherche ;

Catégorie 2 : Recherches nécessitant obligatoirement un processus de surveillance scientifique et éthique spécialisé ;

Catégorie 3 : Recherches interdites.

La dernière révision des recommandations de l'ISSCR date de 2021 et évoque pour la première fois les MCDE humains⁴³. Elles classent dans la catégorie 1 les modèles non intégrés, dans la catégories 2 les modèles intégrés, et dans la catégories 3 le transfert de MCDE humains à des fins de gestation.

Les réflexions des instances internationales et l'avis du Conseil d'orientation de l'agence de la biomédecine

Les réflexions éthiques autour des MCDE font actuellement débat, et peu d'instances se sont officiellement prononcées. En 2019, le comité d'éthique de l'Inserm a publié une note concernant « la recherche sur les embryons et les modèles embryonnaires à usage scientifique (MEUS) », parmi lesquels sont cités les gastruloïdes et les premiers modèles de blastoïdes chez la souris⁴³. Cette note propose de lever l'interdiction de concevoir des embryons humains pour la recherche, ce qui « permettrait de mettre un terme aux controverses concernant le statut moral des MEUS ». Plus récemment, le Conseil de la santé néerlandais a rendu un avis concernant la recherche sur l'embryon et les MCDE en date du 31 octobre 2023⁴⁴. Enfin, au Royaume-Uni, une consultation publique a été lancée dans le cadre de la révision de la loi sur la fertilité et l'embryologie humaines⁴⁵.

Le premier avis entièrement consacré aux MCDE est celui du Conseil d'orientation de l'Agence de la biomédecine en date du 21 septembre 2023¹. Il s'agit de l'instance éthique en charge d'instruire les déclarations de recherche sur les MCDE. L'avis du Conseil d'orientation dresse l'état des lieux des développements scientifiques et des questionnements éthiques liés à la recherche sur les MCDE. Il émet quatre grandes conclusions et recommandations :

⇒ les MCDE humains ne peuvent pas, par essence, être équivalents à des embryons à ce jour, pour deux raisons : (i) l'origine de la genèse de ces structures, à partir de cellules souches, et non pas une conception naturelle ; et (ii) l'intentionnalité : projet parental initial dans le cadre des embryons donnés à la recherche, ce qui n'est pas le cas pour les MCDE ;

⇒ le Conseil d'orientation n'est pas favorable à une extension de la durée limite de culture de l'embryon naturel au-delà de 14 jours. En revanche, il recommande une durée prolongée pour les MCDE jusqu'à l'équivalent du 28^{ème} jour de développement. Le Conseil d'orientation considère cette limite acceptable car à ce stade, l'embryon n'est pas capable de ressentir son environnement ni la

> Notes

42 Lovell-Badge R, Anthony E, Barker RA, et al. ISSCR Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation: The 2021 update. *Stem Cell Rep.* 8 juin 2021;16(6):1398-1408.

43 Comité d'éthique de l'Inserm. Groupe "Embryon et Développement". La recherche sur les embryons et les modèles embryonnaires à usage scientifique (MEUS). [En ligne]. 2019. 24p. [Consulté le 5 février 2024]. Disponible: <https://inserm.hal.science/inserm-02111023/document>

44 The Health Council of the Netherlands. A 28-day rule for research in the Dutch Embryo Act. [En ligne]. 31 oct 2023. 58p. [Consulté le 5 février]. Disponible: <https://www.healthcouncil.nl/latest/news/2023/10/31/a-28-day-rule-for-research-in-the-dutch-embryo-act>

45 Human Fertilization and Embryology Authority (HFEA). Overview of HFEA public consultation on law reform 2023. [En ligne]. nov 2023. [Consulté le 5 février 2024]. Disponible: <https://www.hfea.gov.uk/about-us/modernising-the-regulation-of-fertility-treatment-and-research-involving-human-embryos/overview-of-hfea-public-consultation-on-law-reform-2023/>

douleur. Par ailleurs, il n'apparaît pas souhaitable au Conseil d'orientation d'aller au-delà du 28^{ème} jour, car les chercheurs disposent de modèles alternatifs ;

⇒ le Conseil d'orientation recommande au législateur de créer un cadre légal spécifique pour la recherche sur les MCDE, en plus de celui concernant les CSEh et les cellules iPS, qui semble trop permissif, et celui concernant les embryons, qui apparaît trop contraignant ;

⇒ le Conseil d'orientation propose de revisiter la question du consentement à la recherche, dans le sens d'une actualisation des formulaires d'information et de consentement renseignés par les couples ou les femmes seules désirant donner leurs embryons à la recherche, ou les personnes acceptant de donner des cellules somatiques avec l'objectif de générer des cellules iPS.

En bref

La mise au point des MCDE ouvre de nouvelles perspectives en recherche sur le développement embryonnaire et de possibles pistes thérapeutiques. Ces structures, capables de mimer partiellement l'embryon naturel, pourraient permettre d'étudier des stades du développement embryonnaire inaccessibles à la recherche aujourd'hui. Toutefois, ce domaine est récent et les modèles actuels, développés uniquement par quelques équipes dans le monde, ne peuvent pas être considérés comme une alternative à la recherche sur l'embryon naturel.

Les développements attendus dans les années à venir permettront vraisemblablement d'affiner les modèles, et de les rapprocher de l'embryon naturel. Les réflexions ont d'ores et déjà démarré pour définir l'encadrement le plus adapté pour ces recherches. Ce sont les chercheurs qui, les premiers, ont lancé la réflexion montrant la conscience de la communauté scientifique et la volonté d'évoluer dans un cadre le plus éthique possible.

Il revient à chaque État de définir ses propres règles en s'appuyant sur les avis existants et les comités d'éthique nationaux. Il apparaît également nécessaire, voire indispensable, que le public soit informé et associé aux réflexions. Pour ces modèles, il convient de définir des limites pour trouver le juste équilibre entre liberté de la recherche et encadrement.

En France, l'avis du Conseil d'orientation¹ prend tout son sens dans l'élaboration d'un nouveau cadre légal spécifique aux MCDE. La définition des MDCE dans la loi permettrait de fixer des limites spécifiques, ce qui implique de reconsidérer certains dogmes concernant l'embryon (définition légale, limites, encadrement).

Cette redéfinition doit être intégrée à notre stratégie scientifique nationale pour anticiper les questionnements et faciliter les arbitrages qui valoriseront l'avance prise par la France dans le domaine. Une façon de soutenir et optimiser durablement la performance de nos équipes de recherche.

Supplément 1

Le développement embryonnaire précoce

La 1^{ère} semaine du développement : la phase préimplantatoire

L'union de l'ovocyte, gamète femelle, et du spermatozoïde, gamète mâle, marque le début du développement de l'embryon. L'œuf fécondé qui en résulte, appelé également zygote, entame une série de divisions en même temps qu'il migre dans la trompe de Fallope jusqu'à l'utérus, lieu de la nidation.

Cette première étape de divisions du zygote en 2, 4 puis 8 cellules est appelée segmentation. Lors de la division suivante, des jonctions s'établissent entre les cellules aboutissant à la compaction de l'embryon pour aboutir à une masse cellulaire appelée morula.

À ce stade, toutes les cellules sont identiques. Au cours de la suite du développement embryonnaire, elles vont se spécialiser durant un processus appelé différenciation. La différenciation aboutit à la formation de l'embryon, qui deviendra fœtus et enfin un individu constitué. À sa naissance, un individu est composé d'environ 250 types de cellules différenciées. D'autre part, la différenciation permet également la formation de structures extra-embryonnaires appelées annexes, indispensables au développement et à la survie de l'embryon et du fœtus (le placenta, le cordon ombilical, le sac vitellin et la cavité amniotique).

La première différenciation a lieu au 4^{ème} jour de développement. Elle permet la formation d'une cavité liquide dans la morula, qui devient une structure sphérique d'apparence creuse appelée blastocyste, et composée de 200 cellules environ. Le blastocyste se forme 5 jours après la fécondation et comprend deux types cellulaires différents :

- ⇒ les cellules du trophoblaste, qui se répartissent à la périphérie du blastocyste et formeront, à terme, le placenta ;
- ⇒ les cellules de la masse interne, qui se regroupent à l'intérieur et à un pôle du blastocyste et formeront, à terme, l'embryon et le reste des annexes embryonnaires.

La formation du blastocyste marque le moment où l'œuf se prépare à l'implantation dans l'endomètre et la fin de la période préimplantatoire⁴⁶.

La 2^{ème} semaine de développement : l'implantation et la nidation de l'embryon

Pendant sa transformation en blastocyste, le zygote migre depuis la trompe de Fallope, lieu de la fécondation, vers l'utérus, qui l'accueillera lors de la nidation.

Au moment de l'implantation utérine, ou nidation du blastocyste, les cellules de la masse interne subissent une nouvelle différenciation pour donner naissance à deux types cellulaires :

- ⇒ les cellules de l'épiblaste, qui restent massées à un pôle du blastocyste et formeront, à terme, l'embryon puis le fœtus ;
- ⇒ les cellules de l'endoderme primitif, qui se répartissent en une couche à la surface de la masse interne et formeront le sac vitellin, qui entourera les réserves nutritives de l'embryon et lui permettra de se nourrir au cours de son développement initial.

Ce blastocyste dit « tardif », à 7 jours de la fécondation, est ainsi constitué de trois types cellulaires : les cellules du trophoblaste, les cellules de l'épiblaste et les cellules de l'endoderme primitif.

> Notes

46 Cochard L.R., Netter F., Louryan S. Atlas d'embryologie humaine de Netter. De Boeck Supérieur, 1ère édition; 2015. 292p.

Les 3^{ème} et 4^{ème} semaines : la gastrulation et la neurulation

Après l'implantation complète dans l'endomètre de l'utérus, au 14^{ème} jour après la fécondation, fait suite une étape fondamentale dans le développement embryonnaire appelée la gastrulation. Cette étape, commune à l'ensemble des mammifères, voit le déroulement de trois événements successifs majeurs :

- 1) Les cellules de l'épiblaste, qui forment l'embryon et sont toutes identiques, subissent leur première différenciation en trois types cellulaires, répartis en trois feuillets superposés :
 - ⇒ l'ectoderme, à l'origine de l'épiderme (la peau) et du système nerveux ;
 - ⇒ le mésoderme, à l'origine des os, des muscles, du cœur, des cellules sanguines et de l'appareil urogénital ;
 - ⇒ l'endoderme, à l'origine des appareils digestif et respiratoire, ainsi que des épithéliums glandulaires du foie et du pancréas.
- 2) L'embryon, qui se présentait comme un disque circulaire non orienté, subit des transformations morphologiques importantes avec la mise en place de trois axes de symétrie longitudinale (haut-bas), antéro-postérieure (avant-arrière) et transversale (gauche-droite). C'est à ce moment là que l'embryon perd sa capacité à se scinder en deux jumeaux homozygotes. Dès le début de la gastrulation, l'embryon « s'individualise », et demeurera donc unique jusqu'à la fin de son développement.
- 3) La gastrulation démarre avec l'apparition de la ligne primitive au niveau de la partie postérieure de l'embryon. Cette ligne primitive disparaîtra lors des étapes ultérieures du développement et ne correspond à aucune structure anatomique chez l'individu constitué. Il s'agit d'un sillon qui se forme au sein du disque embryonnaire, à l'intérieur duquel les cellules de l'épiblaste migrent pour former la couche d'endoderme, puis celle du mésoderme. La gastrulation s'achève au 22^{ème} jour de développement.

L'étape suivante, qui commence pendant la gastrulation, est la neurulation. La neurulation va mettre en place l'ébauche du système nerveux central sous la forme d'un tube neural. Elle comprend trois phases : (i) au 19^{ème} jour de développement, un épaississement, la plaque neurale, se forme au sein de l'ectoderme ; (ii) la plaque neurale se creuse pour former un sillon, la gouttière neurale ; (iii) les bords de la gouttière neurale se rapprochent et finissent par fusionner, formant ainsi un tube, le tube neural. La fermeture du tube neural se produit entre le 21^{ème} jour et le 27^{ème} jour de développement, et marque la fin de la neurulation⁴⁷.

> Notes

47 Hoffman LM & Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. juin 2005;23(6):699-708.

Supplément 2

Les modèles de développement embryonnaire, état des connaissances et des techniques.

Les cellules souches pluripotentes

Les modèles cellulaires de développement embryonnaires (MCDE) ont été développés à partir de lignées de cellules qui, dans des conditions de culture définies, sont capables de s'auto-organiser dans l'espace, d'interagir entre elles et de reproduire *in vitro* certaines étapes du développement de l'embryon^{5,6,7}. Ils peuvent être obtenus à partir de deux types cellulaires :

⇒ les cellules prélevées chez l'embryon au stade blastocyste puis mises en culture (CSEh). Deux caractéristiques les rendent particulièrement intéressantes pour la recherche : (i) l'autorenouvellement, elles sont capables de se multiplier indéfiniment et à l'identique *in vitro* et (ii) la pluripotence, elles conservent leurs propriétés embryonnaires et demeurent capables de se différencier dans tous les types cellulaires de l'organisme^{48,49,50}.

⇒ les cellules induites à la pluripotence (iPS) sont obtenues par reprogrammation génétique de cellules adultes différenciées en cellules souches pluripotentes. Elles peuvent être obtenues à partir de cellules de la peau prélevées chez un individu, puis reprogrammées à un état équivalent à celui d'une cellule de l'embryon. Comme les CSEh, les iPS sont pluripotentes et s'autorenouvellent en culture^{51,52}.

Les CSEh et les iPS humaines s'autorenouvellent en culture à un stade équivalent à la pré-gastrulation chez l'embryon. À ce stade, elles attendent un signal pour entamer leur différenciation. En recherche, elles sont classiquement utilisées pour générer un type cellulaire en particulier, en reproduisant *in vitro* les étapes de différenciation *in vivo*. De nombreux types cellulaires ont ainsi pu être produits : neurones, cellules de la rétine, cardiomyocytes, etc. Le plus souvent, l'objectif est de mettre au point un produit de thérapie cellulaire^{53,54,55}.

Dans le cas des MCDE, les cellules sont mises dans des conditions de culture où elles peuvent reprendre l'ensemble de leur développement naturel. Il s'agit donc de reproduire *in vitro* les étapes qui se produisent *in vivo*. La raison pour laquelle la communauté scientifique refuse les termes « embryon synthétique » ou « embryon artificiel » parfois utilisés dans la presse grand public, est qu'il s'agit d'un processus parfaitement naturel. La terminologie MCDE ou encore « embryoïdes », fait référence à l'embryon sans laisser croire qu'il s'agit d'une identité parfaite

Les modèles de gastrulation ou « gastruloïdes »

Les premiers modèles de développement embryonnaire obtenus à partir de cellules souches visaient à reproduire *in vitro* les étapes précédant la gastrulation. La communauté scientifique a baptisé ces modèles « gastruloïdes ».

> Notes

48 Hoffman LM & Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. juin 2005;23(6):699-708.

49 Erceg S, Ronaghi M & Stojković M. Human embryonic stem cell differentiation toward regional specific neural precursors. Stem Cells Dayt Ohio. janv 2009;27(1):78-87.

50 Vazin T & Freed WJ. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. Restor Neurol Neurosci. 2010;28(4):589-603.

51 Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. Cell. 3 avr 2009;137(1):13-17.

52 Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, et al. iPS cells: a game changer for future medicine. EMBO J. 3 mars 2014;33(5):409-417.

53 Golchin A, Chatziparasidou A, Ranjbarvan P, et al. Embryonic Stem Cells in Clinical Trials: Current Overview of Developments and Challenges. Adv Exp Med Biol. 2021;1312:19-37.

54 Illic D & Ogilvie C. Pluripotent Stem Cells in Clinical Setting-New Developments and Overview of Current Status. Stem Cells Dayt Ohio. 26 sept 2022;40(9):791-801.

55 Kim JY, Nam Y, Rim YA, et al. Review of the Current Trends in Clinical Trials Involving Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cell Rev Rep. janv 2022;18(1):142-154.

Le premier de ces modèles a été mis au point en 2014 par l'équipe américaine d'Ali Brivanlou (Rockefeller Institute, New-York)⁵⁶. Il s'agissait d'un modèle en deux dimensions : les CSEh étaient disposées sur une membrane circulaire d'un diamètre compris entre 85 et 100µm, dans un environnement contraint grâce à une technique appelée « micropatterning ». Après avoir été exposées à un inducteur de la gastrulation (BMP4), les cellules se sont différenciées selon une répartition et une cinétique précise et très reproductible. Dans un premier temps, les cellules du centre du cercle se différenciaient en ectoderme, tandis que celles de la périphérie se différenciaient en trophoctoderme pour former un anneau. Entre ces deux couches, les cellules restées indifférenciées finissaient par se différencier dans un deuxième temps, en endoderme pour certaines, puis en mésoderme, dans un troisième temps, pour les autres. Au final, les chercheurs observaient une structure circulaire composée de 4 types cellulaires répartis en 4 cercles concentriques : trophoctoderme, endoderme, mésoderme et ectoderme.

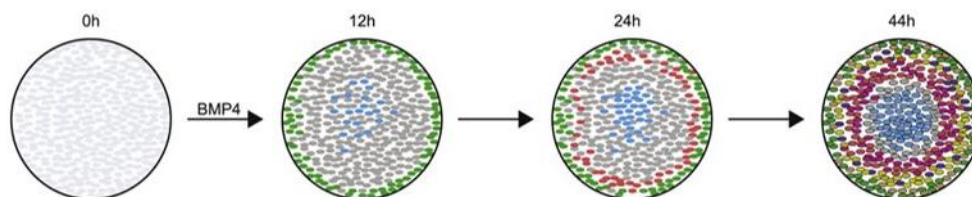


Illustration schématisant l'un des premiers « gastruloïde »⁵⁷

Il s'agissait du premier modèle capable de reproduire *in vitro* les interactions cellulaires qui interviennent lors de la gastrulation. Toutefois, ce modèle se présentait sous forme d'un tapis cellulaire en deux dimensions et ne reproduisait pas l'organisation tridimensionnelle.

Les premiers modèles de gastrulation en trois dimensions ont été développés par l'équipe d'Alfonso Martinez Arias (Université de Cambridge) en 2014 et 2018 chez la souris^{58,59}, puis en 2020 chez l'humain¹⁷. Ces modèles ont été obtenus par l'agrégation d'un petit nombre de CSEh dans des cupules à fond rond, sous un faible volume d'un milieu contenant un inducteur de la gastrulation (le chiron). Ces conditions ont favorisé l'agrégation des cellules interagissant entre elles, et s'auto-organisant spontanément dans l'espace. Les agrégats multicellulaires ainsi générés se sont différenciés pour former successivement les trois types cellulaires résultant de la gastrulation. L'ectoderme, l'endoderme puis le mésoderme se sont ensuite étirés le long d'un axe antéropostérieur, avec une répartition cellulaire caractéristique, comme le ferait un embryon au stade de la gastrulation.

Si ces modèles expérimentaux semblent capables de reproduire *in vitro* une partie du processus de gastrulation, il convient de souligner que, chez l'humain comme chez la souris, ils sont dépourvus de la partie neurale antérieure de l'embryon qui est à l'origine du tissu cérébral. Ces modèles sont également dépourvus des tissus extra-embryonnaires, notamment l'endoderme primitif et le trophoblaste, à l'origine des annexes qui permettraient leur développement à long terme (sac vitellin, placenta, cavité amniotique)^{17,60}.

> Notes

56 Warmflash A, Sorre B, Etoc F, et al. A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells. *Nat Methods*. août 2014;11(8):847-854.

57 Minn KT, Dietmann S, Waye SE, et al. Gene expression dynamics underlying cell fate emergence in 2D micropatterned human embryonic stem cell gastruloids. *Stem Cell Rep*. 11 mai 2021;16(5):1210-1227.

58 Beccari L, Moris N, Girgin M, et al. Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloids. *Nature*. oct 2018;562(7726):272-276.

59 Van den Brink SC, Baillie-Johnson P, Balayo T, et al. Symmetry breaking, germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells. *Dev Camb Engl*. nov 2014;141(22):4231-4242.

60 Aberkane A, Essahib W, Spits C, et al. Expression of adhesion and extracellular matrix genes in human blastocysts upon attachment in a 2D co-culture system. *Mol Hum Reprod*. 1er juill 2018;24(7):375-387.

Ces modèles de gastruloïdes humains sont « non intégrés », car incomplets. Ils n'ont pas le potentiel de se développer en fœtus ou en individu constitué. Ces modèles ne sont pas viables, ni équivalents à l'embryon naturel. Au demeurant, ils sont particulièrement pertinents pour étudier certaines étapes du développement embryonnaire après la gastrulation. Les gastruloïdes ont ainsi permis de modéliser la somitogenèse, phénomène à l'origine de la formation du squelette axial⁶¹. L'étude de l'élongation de la partie centrale de l'embryon, a permis de modéliser certains événements de la neurogenèse et de la cardiogenèse, aboutissant à la formation d'un tube cardiaque battant et innervé⁶².

Les modèles de développement péri-implantatoire

Il s'agit des modèles capables de mimer les étapes du développement qui précèdent ou succèdent immédiatement l'implantation de l'embryon. Ces modèles sont dits « intégrés » car ils sont constitués de la totalité des types cellulaires composant l'embryon et ses annexes. Il convient de distinguer les modèles pré-implantatoires (avant implantation) des modèles post-implantatoires (après l'implantation). Ces derniers ont été les premiers étudiés.

Les modèles post-implantatoires

Historiquement, le premier de ces modèles a été développé chez la souris en 2017⁶³ par l'équipe dirigée par Magdalena Zernicka Goetz au Royaume-Uni (Université de Cambridge). Cette équipe disposait d'une lignée de cellules trophoblastiques (à l'origine du placenta) et d'une lignée de cellules souches embryonnaires murines, les deux types de cellules qui composent le blastocyste. En co-cultivant ces deux types cellulaires sous une membrane nutritive spécifique (Matrigel), cette équipe a observé que les cellules migraient, s'associaient et reconstituaient *in vitro* les étapes du développement embryonnaire post-implantatoire en trois dimensions. Ce modèle était toutefois incomplet car il était dépourvu de la couche cellulaire correspondant à l'endoderme primitif.

Cette équipe et celle dirigée par Jacob Hanna en Israël (Institut Weizman) ont mis au point un modèle murin amélioré. Les trois types cellulaires (cellules du trophoblaste, de l'épiblaste et de l'endoderme primitif, blastocyste tardif) ont été agrégées dans des cupules à fond pyramidal, cultivées durant quelques jours *in vitro*, puis transférées dans un dispositif mis au point par l'équipe israélienne. Ce dispositif permet la culture des cellules au sein de bouteilles maintenues horizontalement et placées sur un système rotatif, sous pression gazeuse ajustée). Grâce à ce dispositif, les embryons murins naturels ont pu être cultivés pendant 11,5 jours pour une gestation totale de 20 jours chez la souris⁶⁴.

Les deux équipes britannique et israélienne ont publié, à deux semaines d'intervalle, des observations similaires décrivant le maintien en culture de MCDE murins jusqu'à un stade équivalent à 8,5 jours de développement^{65,66}. Même si moins de 1 % des MCDE générés ont atteint ce stade, il convient de souligner qu'ils contenaient l'ensemble des cellules embryonnaires et extra-embryonnaires normalement présentes à ce stade, y compris les ébauches du système nerveux, du tube digestif et d'un cœur battant avec une circulation sanguine.

Ces deux mêmes équipes ont développé chacune un modèle humain analogue, dont les premières observations ont été publiées récemment à trois mois d'intervalle^{67,68}. Elles ont cultivé les MCDE humains jusqu'à un stade équivalent au 14^{ème} jour de développement, avec apparition de la ligne primitive. Si le

> Notes

61 Miao Y, Djeflal Y, De Simone A, et al. Reconstruction and deconstruction of human somitogenesis in vitro. *Nature*. févr 2023;614(7948):500-508.

62 Olmsted ZT & Paluh JL. A combined human gastruloid model of cardiogenesis and neurogenesis. *iScience*. 17 juin 2022;25(6):24p.

63 Harrison SE, Sozen B, Christodoulou N, et al. Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro. *Science*. 14 avr 2017;356(6334):13p.

64 Aguilera-Castrejon A, Oldak B, Shani T, et al. Ex utero mouse embryogenesis from pre-gastrulation to late organogenesis. *Nature*. mai 2021;593(7857):119-124.

65 Amadei G, Handford CE, Qiu C, et al. Embryo model completes gastrulation to neurulation and organogenesis. *Nature*. oct 2022;610(7930):143-153.

66 Tarazi S, Aguilera-Castrejon A, Joubert C, et al. Post-gastrulation synthetic embryos generated ex utero from mouse naive ESCs. *Cell*. 1er sept 2022;185(18):3290-3306.

67 Oldak B, Wildschutz E, Bondarenko V, et al. Complete human day 14 post-implantation embryo models from naive ES cells. *Nature*. oct 2023;622(7983):562-573.

68 Weatherbee BAT, Gantner CW, Iwamoto-Stohl LK, et al. Pluripotent stem cell-derived model of the post-implantation human embryo. *Nature*. oct 2023;622(7983):584-593.

modèle britannique apparaît plus efficace (20 % des MCDE ayant atteint ce stade contre moins de 1 % pour l'équipe israélienne), le modèle développé par l'équipe de Jacob Hanna apparaît plus complet. Il reconstitue la totalité des feuillets, annexes et cavités attendus à ce stade de développement de l'embryon. Il s'agit, à ce jour, du modèle se rapprochant le plus de l'embryon naturel⁶⁷.

Les modèles pré-implantatoires ou « blastoïdes »

Les modèles de type « blastoïdes » ont été développés en vue de reconstituer *in vitro* le blastocyste naturel qui, pour rappel, se forme chez l'humain au 5^{ème} jour de développement, juste avant la nidation. Il s'agit d'une structure sphérique d'apparence creuse composée de deux types cellulaires : (i) les cellules du trophoblaste, à l'origine du placenta, situées à la périphérie du blastocyste, et (ii) les cellules de l'épiblaste, l'origine de l'embryon et d'autres annexes, massées à un pôle de l'embryon. Une cavité est présente au centre du blastocyste, le blastocèle.

Les premiers modèles de blastoïdes ont été développés en 2018 chez la souris par l'équipe de Nicolas Rivron aux Pays-Bas (Université de Maastricht)³³, par agrégation de cellules du trophoblaste et de cellules de l'épiblaste. Les cellules ainsi agrégées ont reconstitué spontanément *in vitro* la structure tridimensionnelle et la composition cellulaire du blastocyste naturel. Chez l'humain, les premiers modèles de blastoïdes générés à partir de cellules pluripotentes ont été rapportés en 2021^{20 22}.

Depuis 2018, une quinzaine d'équipes dans le monde ont développé des modèles de blastoïdes chez la souris et/ou chez l'humain, y compris l'équipe de Magdalena Zernicka Goetz^{21,69} et celle de Nicolas Rivron, (Institut de biotechnologie moléculaire de Vienne depuis 2019)¹⁹. Ces modèles diffèrent les uns des autres par le type de cellules utilisées (iPS ou CSEh), la lignée cellulaire choisie, ainsi que par les conditions de culture avant et pendant l'agrégation (milieu de culture, cupules à bout arrondi ou en forme de pyramide inversée).

Les techniques publiées n'ont pas la même efficacité, allant de quelques pourcents à plus de 80 % d'obtention de blastoïdes, et induisent la présence plus ou moins importante de cellules « off-target », normalement absentes du blastocyste naturel^{35,36}. Il s'agit généralement de cellules à un stade postérieur de différenciation. Les deux modèles les plus aboutis sont ceux mis au point par les équipes de Nicolas Rivron en Autriche et Austin Smith au Royaume-Uni^{19,70}.

L'un des principaux intérêts à disposer de modèles de blastoïdes chez l'animal, est de pouvoir évaluer leur capacité à s'implanter après transfert, puis à reproduire le développement complet de l'embryon pour donner naissance à un nouveau-né. Des expériences de ce type ont été menées chez la souris et le macaque, un primate non humain. Les blastoïdes sont capables de s'implanter après transfert, mais incapables de se développer à terme^{33,34}. À ce jour, aucune naissance n'a été observée après transfert de blastoïde quelle que soit l'espèce étudiée.

Chez l'humain, les expériences de transfert sont inenvisageables pour des raisons éthiques. Pour autant, il est possible d'évaluer la capacité des blastoïdes à s'implanter *in vitro*. L'équipe de Nicolas Rivron a ainsi développé un modèle d'organoïdes d'endomètre sur lequel s'implantent des blastoïdes humains avec une efficacité de 30 %¹⁹. Les blastoïdes ont par la suite été cultivés pendant 6 jours, la culture ayant été interrompue à l'équivalent du 13^{ème} jour chez l'embryon naturel.

À noter que l'équipe de Thorold Theunissen aux États-Unis (Université du Missouri à Saint-Louis) a eu l'autorisation du comité d'éthique local pour cultiver des blastoïdes jusqu'à l'équivalent du 21^{ème} jour chez l'embryon naturel. Son modèle de culture prolongée en trois dimensions, incluant la culture des blastoïdes sous une gélose nutritive de type Matrigel, a montré l'apparition d'une ligne primitive le 18^{ème} jour, puis la formation d'endoderme, de mésoderme, et de cellules germinales (précurseurs des gamètes) le 21^{ème} jour²⁶.

> Notes

69 Sozen B, Cox AL, De Jonghe J, et al. Self-Organization of Mouse Stem Cells into an Extended Potential Blastoid. Dev Cell. 16 déc 2019;51(6):698-712.

70 Yanagida A, Spindlow D, Nichols J, et al. Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation. Cell Stem Cell. 3 juin 2021;28(6):1016-1022.