

► L'étude du développement humain est indispensable afin d'approfondir nos connaissances et, à long terme, perfectionner nos stratégies thérapeutiques dans les domaines de la médecine de la reproduction et de la médecine régénératrice. Face à la limite d'accès aux embryons surnuméraires et à l'interdiction d'en créer de nouveaux seulement à des fins de recherche, deux stratégies alternatives peuvent être proposées pour étudier le développement embryonnaire humain. La première consiste à fabriquer des pseudo-embryons ou blastoïdes. La seconde consiste à créer des embryons chimères homme/animal par injection de cellules souches pluripotentes, ES ou iPS, dans des embryons d'animaux. Nous expliquons ici l'importance de ces nouveaux paradigmes expérimentaux pour étudier le développement humain, et leur complémentarité. ◀

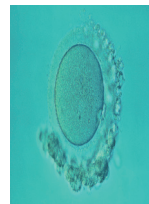
La France a entrepris de réviser sa législation relative à la bioéthique. Dans le projet de loi relatif à la bioéthique définitivement adopté par l'Assemblée nationale le 29 juin 2021, quatre articles sont consacrés à la recherche sur les embryons humains, les cellules souches embryonnaires (cellules ES), et les cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS). Ils visent à encadrer cette recherche, s'agissant en particulier de la modification génétique de l'embryon humain, la différenciation des cellules souches pluripotentes en cellules germinales, ainsi que la création de pseudo-embryons (appelés aussi blastoïdes), et d'embryons chimères homme/animal.

### La recherche sur l'embryon humain

Nos connaissances sur les mécanismes génétiques du développement embryonnaire et fœtal reposent en grande partie sur les travaux réalisés chez la souris depuis plusieurs décennies. Ces connaissances ont été déterminantes dans nombre de domaines d'intérêt médical, la technique

## Des embryons chimères et des pseudo-embryons comme alternatives pour la recherche sur l'embryon humain

Pierre Savatier<sup>1,7</sup>, Laurent David<sup>2,7</sup>,  
John De Vos<sup>3,7</sup>, Frank Yates<sup>4,7</sup>,  
Shahragim Tajbakhsh<sup>5,7</sup>, Cécile Martinat<sup>6,7</sup>



<sup>1</sup>Univ Lyon, Université Lyon 1, Inserm, Institut Cellule Souche et Cerveau (*Stem-Cell and Brain Research Institute*), U1208, 18 avenue Doyen Lépine, F-69500 Bron, France.

<sup>2</sup>Université de Nantes, CHU Nantes, Inserm, CNRS, SFR Santé, Inserm UMS 016, CNRS UMS 3556, CRTI, Inserm UMR1064, F-44000 Nantes, France.

<sup>3</sup>IRMB (*Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy*), Univ Montpellier, Inserm, CHU de Montpellier, 191 avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier, France.

<sup>4</sup>CellTechs Laboratory, Sup'Biotech, 94800 Villejuif, France.

<sup>5</sup>Laboratoire Cellules souches et développement, CNRS UM33728, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

<sup>6</sup>Inserm, UEVE (Université Évry Val d'Essonne), UMR 861, I-STEM (Institut des cellules souches pour le traitement et l'étude des maladies monogéniques), 91100 Corbeil-Essonnes, France.

<sup>7</sup>Membres actifs élus au conseil d'administration de la société française de recherche sur les cellules souches (FSSCR) [pierre.savatier@inserm.fr](mailto:pierre.savatier@inserm.fr)

fondée sur les cellules souches pluripotentes induites (iPS) en étant l'un des aboutissements les plus marquants. L'étude du développement humain s'avère maintenant indispensable pour approfondir nos connaissances et, à long terme, perfectionner nos stratégies thérapeutiques dans les domaines de la médecine de la reproduction et de la médecine régénératrice. Pour cette raison, la recherche sur l'embryon humain est l'objet d'un intérêt croissant au niveau mondial en dépit des difficultés techniques et des questionnements éthiques qu'elle soulève. Dans la plupart des pays, dont la France, seules les recherches sur les embryons dits surnuméraires sont autorisées. Ces embryons sont conçus dans le cadre d'une assistance

Vignette (Photo © Inserm/Lassalle, Bruno).



médicale à la procréation, puis congelés dans l'attente d'une utilisation ultérieure. Lorsque le couple décide de mettre un terme à son projet parental, les embryons encore conservés congelés peuvent être cédés à la recherche, après l'obtention d'un consentement explicite. Cependant, du fait de la congélation au stade de la morula ou du blastocyste, les étapes antérieures de leur développement ne sont plus accessibles à l'expérimentation. En revanche, il est aujourd'hui possible de cultiver des embryons humains jusqu'au jour 14 du développement embryonnaire, cette limite issue d'un consensus international étant d'ailleurs inscrite dans le projet de loi relatif à la bioéthique adopté le 29 juin 2021.

Une façon d'établir sans équivoque le rôle d'un gène dans le développement humain consiste à invalider son expression dans des embryons, par exemple avec la technique CRISPR/Cas9. Cette technique doit être appliquée à des embryons très jeunes, idéalement au stade 1 cellule (zygote), afin que la modification génétique introduite soit intégrée dans toutes les cellules de l'embryon. La France, qui a signé la convention d'Oviedo en 1997<sup>1</sup>, interdit la création d'embryons pour la recherche, ce qui limite considérablement la portée de l'autorisation de modifier le génome de l'embryon humain à des fins de recherche telle que proposée dans le projet de loi récemment adopté. Néanmoins, d'autres applications sont envisageables comme, par exemple, utiliser des lentivirus pour « étiqueter » les cellules de l'embryon à un stade précoce du développement et suivre le destin de leur descendance jusqu'au 14<sup>e</sup> jour de développement *in vitro*. Rappelons pour finir que la nouvelle loi interdit formellement le transfert d'embryons génétiquement modifiés à des fins de gestation.

Si elle devait être un jour autorisée, la création d'embryons destinés à la recherche se heurterait à un autre problème : la disponibilité d'ovocytes humains cédés à la recherche pour la fécondation *in vitro*. Une stratégie alternative consisterait alors à fabriquer ces ovocytes à partir de cellules souches pluripotentes, ES (cellules souches embryonnaires) ou iPS, puis à les féconder par injection intracellulaire d'un spermatozoïde humain. Ce paradigme expérimental a été développé chez la souris, et des souriceaux sains ont été ainsi obtenus [1]. Plusieurs équipes travaillent au développement d'une technique similaire chez l'homme [2]. La nouvelle loi relative à la bioéthique propose d'encadrer la recherche sur la gamétogenèse à partir de cellules souches. Néanmoins, il reste interdit d'utiliser les gamètes ainsi engendrées pour réaliser une fécondation.

## Les modèles alternatifs

Face à la limite d'accès aux embryons surnuméraires et à l'interdiction d'en créer de nouveaux pour la recherche, deux stratégies alternatives peuvent être proposées pour étudier le développement embryonnaire humain. La première consiste à fabriquer des pseudo-embryons, appelés aussi blastoïdes car ils miment l'embryon au stade du blastocyste, le stade qui précède l'implantation intra-utérine chez la femme. Les

blastoïdes sont obtenus à partir de cellules souches pluripotentes, ES ou iPS. Ce nouveau modèle expérimental a été d'abord développé chez la souris [3], puis récemment appliqué à l'homme [4, 5]. Les blastoïdes correspondent *a priori* à un stade de développement après la morula. On ne sait pas encore jusqu'à quel stade ces blastoïdes sont capables de se développer *in vitro*, et jusqu'à quel point ils pourront, à terme, remplacer les véritables embryons pour la recherche. Le nouveau projet de loi relatif à la bioéthique propose d'encadrer cette recherche.

La seconde stratégie consiste à créer des embryons chimères par injection de cellules souches pluripotentes, ES ou iPS, dans des embryons « hôtes ». Ce modèle expérimental est inspiré des chimères germinales de souris, dans lesquelles les cellules souches pluripotentes introduites dans la morula ou le blastocyste colonisent l'embryon et participent, parfois massivement, au développement de tous les organes. On peut introduire une mutation dans les cellules souches pluripotentes, puis étudier les conséquences sur leur devenir dans l'embryon, après qu'il a été replacé dans l'utérus. L'application de ce paradigme aux cellules souches pluripotentes humaines est complexe, et la question du choix de l'embryon hôte est particulièrement délicate. Par analogie au modèle de la souris, il semblerait cohérent d'introduire les cellules dans des embryons humains mais, comme nous l'avons dit, l'accès à ces embryons est limité. De plus, en application d'un consensus international, l'embryon humain ne peut pas être cultivé au-delà du 14<sup>e</sup> jour de développement, c'est-à-dire avant l'apparition de la ligne primitive, ce qui limite considérablement le champ d'étude [6]. Une première alternative consiste à utiliser les blastoïdes comme hôtes, mais nous ne savons pas encore si les premières étapes de la différenciation sont correctement modélisées dans ces pseudo-embryons. Une autre alternative consiste à utiliser des embryons d'animaux pour créer des chimères « inter-espèces ». Des cellules souches pluripotentes humaines ont été injectées dans des embryons de souris, de lapin ou de porc, et leur devenir a été étudié après transfert des embryons chimères dans l'utérus animal [7, 8]. Dans la plupart des cas, le nombre de cellules humaines capables de se développer dans les fœtus était très faible (par exemple, moins d'une cellule humaine sur 10 000 cellules porcines), ce qui peut s'expliquer par la distance phylogénétique entre les espèces. Très récemment, des expériences similaires ont été réalisées, en utilisant des embryons de singe macaque phylogénétiquement plus proche de l'homme, avec des résultats encore médiocres, mais encourageants [9, 10]. Ces recherches soulèvent toutefois des questions éthiques, en particulier lorsqu'elles sont susceptibles

<sup>1</sup> La France a signé la convention le 4 avril 1997 et l'a ratifiée le 13 décembre 2011 pour une entrée en vigueur le 1er avril 2012. <https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDCTMContent?documentId=09000168007cf99>

de conduire à un chimérisme cellulaire dans le cerveau et la lignée germinale [11]. Le projet de loi relatif à la bioéthique qui vient d'être adopté réglemente ce type de recherches, en confiant leur encadrement à l'Agence de la biomédecine. En outre, il interdit strictement l'ajout de cellules animales à des embryons humains, quelle qu'en soit la finalité.

## Conclusions

Embryons chimères et pseudo-embryons constituent des nouveaux champs de recherche permettant d'étudier le développement embryonnaire humain, sans faire appel à des embryons surnuméraires. Comme les embryons chimères et les pseudo-embryons ne sont pas des embryons humains, ils échappent de ce fait à la réglementation, qui limite à 14 jours la durée du développement *in vitro* des embryons humains. Des réflexions sur ce délai sont en cours, et il est possible que cette limite soit progressivement repoussée à 21 jours [12]. Les embryons chimères et les pseudo-embryons constituent donc des alternatives précieuses pour déchiffrer les mécanismes génétiques de la gastrulation et de l'organogenèse humaine, et compléter ainsi le socle des connaissances indispensables pour le développement de la médecine régénératrice. ♦

## SUMMARY

### Chimeric embryos and pseudo-embryos: An alternative to human embryos for research

The study of human development is essential to further our knowledge and to improve our therapeutic strategies in the fields of reproductive and regenerative medicine. Given the limited access to supernumerary embryos and the prohibition on creating new ones for research, two alternative strategies can be proposed to study human embryonic development. The first is to create pseudo-embryos or blastoids. The second is to create human/animal chimeric embryos by injecting pluripotent stem cells, ES or iPS, into animal embryos. We explain herein

the importance of these new experimental paradigms for studying human development and their complementarity. ♦

## LIENS D'INTÉRÊT

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

## RÉFÉRENCES

1. Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, *et al.* Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature* 2016 ; 539 : 299-303.
2. Yamashiro C, Sasaki K, Yokobayashi S, *et al.* Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in culture. *Nat Protoc* 2020 ; 15 : 1560-83.
3. Rivron NC, Frias-Aldeguer J, Vrij EJ, *et al.* Blastocyst-like structures generated solely from stem cells. *Nature* 2018 ; 557 : 106-11.
4. Yu L, Wei Y, Duan J, *et al.* Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. *Nature* 2021 ; 591 : 620-6.
5. Zheng Y, Fu J. First complete model of the human embryo. *Nature* 2021 ; 591 : 531-2.
6. Pera MF. Human embryo research and the 14-day rule. *Development* 2017 ; 144 : 1923-5.
7. Theunissen TW, Friedli M, He Y, *et al.* Molecular criteria for defining the naive human pluripotent state. *Cell Stem Cell* 2016 ; 19 : 502-15.
8. Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, *et al.* Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells. *Cell* 2017 ; 168 : 473-86 e15.
9. Aksoy I, Rognard C, Moulin A, *et al.* Apoptosis, G1 phase stall, and premature differentiation account for low chimeric competence of human and rhesus monkey naive pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 2021 ; 16 : 56-74.
10. Tan T, Wu J, Si C, *et al.* Chimeric contribution of human extended pluripotent stem cells to monkey embryos *ex vivo*. *Cell* 2021 ; 184 : 2020-32e14.
11. Crane AT, Voth JP, Shen FX, Low WC. Concise review. Human-animal neurological chimeras: humanized animals or human cells in an animal? *Stem Cells* 2019 ; 37 : 444-52.
12. Hyun I, Bredenoord AL, Briscoe J, *et al.* Human embryo research beyond the primitive streak. *Science* 2021 ; 371 : 998-1000.

## TIRÉS À PART

P. Savatier



Avec m/s, vivez en direct  
les progrès et débats  
de la biologie et de la médecine

CHAQUE MOIS / AVEC LES ARTICLES DE RÉFÉRENCE DE M/S  
CHAQUE JOUR / SUR WWW.MEDECINESCIENCES.ORG

Abonnez-vous sur

[www.medecinesciences.org](http://www.medecinesciences.org)

