

Nominé pour le prix CUNINOV 2005

Isolement de lignées de cellules souches embryonnaires chez le lapin.

L'équipe : Marielle Afanassieff et Suzy Markossian (PrimaStem - Institut National de la Recherche Agronomique et Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)

PrimaStem est une plate-forme biotechnologique soutenue à la fois par l'Inra et l'Inserm (Unité Soutenue en Commun n°2008) et hébergée dans les locaux de l'unité Inserm 371 à Bron. L'unité 371 s'intéresse à la thérapie cellulaire des maladies neurodégénératives chez les primates. PrimaStem a été créée en 2004, dans le but d'isoler des lignées de cellules souches embryonnaires (cellules ES) chez les mammifères non-murins et d'améliorer leurs conditions de culture. Au sein de cette plate-forme, nous sommes deux personnes, Marielle Afanassieff (CR1 Inra) et Suzy Markossian (AI Inra), impliquées dans la recherche sur les animaux d'intérêt agronomique. Nous développons plus particulièrement un projet qui vise à isoler des lignées de cellules ES chez le lapin. Nous possédons toutes les deux une solide formation en biologie moléculaire et cellulaire et une bonne expérience de la culture de cellules ES murines. En effet, nous avons travaillé auparavant à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, sur l'étude du cycle cellulaire des cellules ES de souris dans l'équipe dirigée par Pierre Savatier de l'unité mixte Cnrs 5161 et Inra 1237. Nous collaborons sur ce projet de recherche avec Thierry Joly, Enseignant-Chercheur à l'Institut Supérieur d'Agriculture Rhône-Alpes, pour l'obtention des embryons de lapin.

L'étude

Les cellules souches embryonnaires ou cellules ES dérivent du bouton embryonnaire de blastocystes, c'est-à-dire d'embryons précoces non-implantés dans la muqueuse utérine. Les cellules ES possèdent deux caractéristiques qui les rendent uniques: (i) elles sont pluripotentes, c'est-à-dire capables de se différencier dans tous les lignages cellulaires somatiques et germinaux qui composent un organisme adulte; et (ii) elles sont capables de s'autorenouveler, c'est-à-dire de se multiplier indéfiniment en culture sans perdre leurs propriétés de différenciation. Jusqu'à présent, des cellules ES de mammifère ont été isolées uniquement chez les rongeurs et les primates. Les cellules ES murines ont révolutionné la recherche en biologie du développement chez la souris, en permettant la création de souris transgéniques présentant des mutations ciblées. En effet, ces cellules peuvent être modifiées génétiquement en culture, puis être introduites dans un embryon receveur dont elles vont coloniser tous les tissus; on obtient alors un animal chimère qui sera le fondateur d'une nouvelle lignée de souris transgéniques. Chez les primates, et particulièrement chez l'homme, les cellules ES représentent un nouvel espoir thérapeutique pour toutes les maladies dégénératives. En effet, ces cellules peuvent être amplifiées en culture, différenciées dans un lignage spécifique et injectées chez un patient présentant une déficience d'un type cellulaire donné. De nombreuses équipes de recherche travaillent actuellement sur ce nouveau type de thérapie, appelée thérapie cellulaire. Chez les animaux d'intérêt agronomique, les cellules ES permettraient de mettre au point des techniques de transfert de gènes et de modifications génétiques beaucoup plus ciblées que les techniques de microinjection de gènes utilisées actuellement chez certains animaux. Elles constitueraient à la fois un complément et une alternative aux techniques de clonage par transfert nucléaire, techniques encore lourdes, coûteuses et aléatoires. L'obtention d'animaux transgéniques présenterait non seulement un intérêt fondamental, comme chez la souris, pour l'étude de divers mécanismes biologiques et physiologiques, mais aussi un enjeu économique important avec l'amélioration possible des rendements de production, de la qualité de la viande ou de la résistance aux maladies. Les cellules ES permettraient par ailleurs de créer des réacteurs biologiques, c'est-à-dire des animaux capables de produire, dans leur lait, des protéines d'intérêt pharmaceutique en grande quantité.

Les nombreuses tentatives d'isolement de lignées de cellules ES chez les espèces d'intérêt agronomique ont jusqu'à maintenant échouées. En effet, que ce soit chez le porc, le bovin, le mouton, la chèvre ou le lapin, des cultures de cellules blastocytaires présentant certaines caractéristiques de cellules ES ont pu être isolées, mais ces cellules se différencient toujours spontanément après quelques jours ou quelques semaines de culture. Les approches utilisées jusqu'à présent pour isoler des cellules ES chez des animaux d'intérêt agronomique reproduisaient essentiellement les conditions expérimentales mises au point pour l'isolement et la culture de cellules ES de souris. Elles reposaient donc sur l'hypothèse selon laquelle les voies de signalisation moléculaire impliquées dans le maintien des cellules ES murines en autorenouvellement étaient également opérationnelles chez les autres espèces. Or des études récentes sur la prolifération et la pluripotence des cellules ES de primates montrent que cette hypothèse est vraisemblablement fautive, et que les voies de signalisation moléculaire contrôlant l'autorenouvellement des cellules ES diffèrent selon les espèces. En revanche, ces mêmes études ont montré l'existence de facteurs essentiels pour le maintien de la pluripotence des cellules ES, communs à la souris et aux primates. Parmi ces derniers, deux facteurs de transcription apparaissent indispensables, non seulement au maintien de la pluripotence des cellules ES *in vitro*, mais également au développement embryonnaire normal *in vivo*: ce sont les facteurs Oct-4 et Nanog. Ces facteurs sont probablement capables, individuellement ou en combinaison, d'exercer un effet inhibiteur sur la différenciation des cellules souches embryonnaires de tous les mammifères. Ainsi, l'introduction de ces facteurs dans des cellules blastocytaires lors de leur mise en culture, devrait permettre de stimuler l'autorenouvellement de ces cellules souches et de faciliter ainsi l'établissement de lignées de cellules ES chez les espèces choisies.

Nous proposons donc de mettre en culture des cellules blastocytaires isolées par immunochirurgie à partir d'embryons frais ou congelés de lapin. Nous induirons alors dans ces cellules, l'expression des facteurs Oct-4 et/ou Nanog afin de stimuler leur capacité d'autorenouvellement. Dans cet objectif, nous utiliserons deux techniques : (i) la première permet de modifier génétiquement les cellules blastocytaires, en introduisant dans leur génome les gènes *Oct-4* et/ou *Nanog* à l'aide d'un vecteur dérivé du Virus de l'Immunodéficience Simienne; ce vecteur est capable d'infecter les cellules de lapin, mais est incapable de s'autorépliquer et donc de se propager ; (ii) la seconde technique permet d'introduire directement dans les cellules blastocytaires les protéines Oct-4 et/ou Nanog sous forme de Tat-protéines fusions, sans avoir à modifier génétiquement les cellules; cette méthode repose sur la propriété de pénétration membranaire de la protéine Tat du Virus de l'Immunodéficience Humaine. Nos premiers essais de culture de cellules embryonnaires de lapin ont été réalisés sans utiliser les facteurs Oct-4 et Nanog. Ces essais ont donné des résultats très encourageants. En effet, nous obtenons des cultures de cellules blastocytaires qui présentent la morphologie et certaines caractéristiques des cellules ES de primates, mais qui sont toutefois incapables de se maintenir indéfiniment en culture. Nous travaillons donc actuellement à leur modification *in vitro*, afin qu'elles soient capables, sous l'action des facteurs Oct-4 et/ou Nanog, de s'autorenouveler indéfiniment. Nous pourrions ainsi isoler de véritables lignées de cellules ES de lapin.

L'isolement de lignées de cellules ES chez le lapin serait une source importante d'innovation technique dans le secteur cynicole, en permettant le développement des techniques de transgénése et de transfert nucléaire. Les lapins transgéniques ainsi obtenus pourraient être employés en recherche fondamentale comme modèles de maladies humaines, car le métabolisme du lapin est très proche de celui de l'homme. Ces techniques seraient également utiles à l'industrie pharmaceutique avec la création de lapins bio-réacteurs, c'est-à-dire producteurs de protéines d'intérêt dans le lait. On peut également envisager d'autres applications pour la filière cynicole, comme l'obtention de lapins possédant une qualité accrue de leur viande ou de leur fourrure. L'isolement de cellules ES chez le lapin serait donc un progrès évident pour tout le secteur cynicole.

Marielle Afanassieff et Suzy Markossian

PrimaStem, Inserm U371

18 Avenue du Doyen Lépine, 69675 Bron Cedex

Tél : 04 72 91 34 44 ; Fax : 04 72 91 34 61 ; Courriel : afanassieff@lyon.inserm.fr