

Cellules souches pluripotentes de rat : so what ?

Rat embryonic stem cells. So what ?

John De Vos

Les cellules souches embryonnaires (ES) font l'objet d'une large couverture médiatique en raison des potentialités thérapeutiques ainsi que des questions éthiques qu'elles soulèvent. Mais à côté de ces promesses et de ces débats, ces cellules ont d'abord joué un rôle moins médiatisé et pourtant central en biologie moderne, comme outil pour la création des souris « Knock-out » (KO) et transgéniques. C'est en effet par la manipulation génétique des cellules ES de souris et leur injection dans un embryon au stade de blastocyste, ou leur agrégation à un embryon au stade plus précoce de morula, que l'on obtient des souris chimères dont une partie des cellules, y compris germinales, est porteuse de la mutation génétique. Le croisement des souris chimères entre elles peut aboutir à des souris homozygotes pour la modification génétique, c'est à dire que chaque cellule porte alors l'altération génétique désirée. Celle-ci peut être soit l'invalidation d'un gène par recombinaison homologue (souris KO) soit l'addition d'un gène supplémentaire (souris transgéniques). Cette technique a révolutionné la biologie en permettant de comprendre la fonction des gènes au cours du développement et dans le fonctionnement d'un mammifère adulte. Elle a également permis la création de nombreux modèles murins de pathologies humaines. Plus de 11 000 gènes ont déjà été invalidés chez la souris, et des programmes internationaux sont en cours pour arriver à disposer des animaux KO pour chacun des gènes de la souris [1]. En 2007, le prix Nobel de médecine a été attribué à Martin Evans, Mario Capecchi et Oliver Smithies pour récompenser leurs travaux sur les cellules souches embryonnaires de souris et la recombinaison homologue, et dont le mariage avait abouti aux premières souris KO [2].

Mais jusqu'à présent, la technique ne s'appliquait qu'à la souris. En effet, l'impossibilité de dériver de véritables cellules ES chez le rat avait fait échouer les tentatives de création d'animaux KO chez cette espèce. Deux publications

viennent de changer la donne et rapportent la dérivation de cellules souches embryonnaires de rat et montrent la possibilité d'obtenir des rats chimériques avec transmission germinale du patrimoine des ES. La solution du problème est passé par la découverte début 2008 par l'équipe d'Austin Smith de nouvelles conditions de culture des cellules ES murine, basé sur un cocktail de trois inhibiteurs chimiques appelée « 3i » [3]. Alors que les conditions de dérivation « classiques » des ES de souris, utilisant un feeder de fibroblastes embryonnaires et le facteur de croissance LIF, n'avaient pas permis l'obtention d'ES de rat, les 3i se sont avérés plus efficaces, entraînant l'expansion en culture de la masse cellulaire interne des blastocystes de rat et la dérivation de cellules souches embryonnaires de rat [4, 5]. Cette application de la technologie des ES à une autre espèce de rongeur est une avancée considérable pour le développement des futures thérapeutiques humaines car elle ouvre la porte aux rats KO et transgéniques. Or le rat est, pour de nombreuses pathologies humaines, un bien meilleur modèle pré-clinique que la souris, en particulier pour la compréhension des pathologies comportementales et les pathologies multifactorielles.

Le développement d'une autre technologie, celle des cellules souches pluripotentes induites (iPS) [6] pourrait également aboutir à la création de rats KO. Deux équipes viennent en effet de rapporter la création d'iPS de rat qui présentent (presque) toutes les caractéristiques des cellules souches embryonnaires : une signature d'expression génique de pluripotence, un caryotype normal, une prolifération prolongée – voire illimitée, mais un recul supplémentaire est requis - et une capacité de différenciation in vivo en tissus des trois feuillets embryonnaires [7-9]. Après injection dans la souris NOD/SCID ces iPS de rat forment des tératomes. Et l'injection des iPS de rat dans des blastocystes de rat a abouti à la formation de rats dont le chimérisme est démontré par la couleur de la fourrure des animaux obtenus. Malheureusement, au cours de ces premières expériences, aucune transmission à la lignée germinale n'a été observée. Mais compte tenu des résultats obtenus à partir des cellules ES de rat d'une part, et de la possibilité de générer à partir d'iPS de souris des animaux chimères transmettant à leurs cellules germinale le patrimoine génétique des iPS , il est vraisemblable qu'il

soit possible à court terme de générer des rats KO ou transgéniques grâce à la technologie des iPS.

Ces résultats permettent d'envisager la création d'animaux génétiquement modifiés par la technologie des iPS dès lors que la reprogrammation sera accessible pour une espèce animale donnée. La transgénèse chez les animaux était jusque là possible uniquement par manipulation génétique d'embryons par vecteurs rétroviraux, tel que le poisson « Glofish » rendu fluorescent par l'expression de la protéine GFP issue de la méduse *Aequorea victoria* et commercialisé aujourd'hui pour l'aquariophilie [10]. Mais la technologie des iPS permettra d'utiliser d'autres méthodes de manipulation génétiques, en particulier la recombinaison homologue, et de créer des animaux KO différents de la souris. Pour cela il faudra montrer qu'il est possible d'élargir la liste des animaux dont les cellules sont reprogrammables, aujourd'hui restreinte à la souris, le rat, le primate non humain et l'homme [7]. Il sera aussi nécessaire de contourner l'utilisation des rétro- et lentivirus pour la reprogrammation, dont l'intégration dans l'ADN engendre une altération non contrôlée du génome de la cellule cible. Ces obstacles franchis, des iPS issues d'animaux tels que le chien, le mouton ou le porc – pour lesquels des lignées ES indiscutables n'ont pas encore été établies - pourraient faciliter la création de KO de grands animaux, qui seraient de meilleurs modèles précliniques que les rongeurs.

Austin CP, Battey JF, Bradley A, et al. The knockout mouse project. *Nat Genet* 2004; 36: 921-4.

Cohen-Tannoudji M. [Nobel Prize 2007 for Medicine to Mario Capecchi, Martin Evans and Oliver Smithies: the mutant mice to order]. *Med Sci (Paris)* 2007; 23: 1159-61.

Ying QL, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008; 453: 519-23.

Buehr M, Meek S, Blair K, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 2008; 135: 1287-98.

Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 2008; 135: 1299-310.

Coulombel L. [How to teach an old fibroblast to do new tricks]. *Med Sci (Paris)* 2007; 23: 667-70.

Trounson A. Rats, cats, and elephants, but still no unicorn: induced pluripotent stem cells from new species. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 3-4.

Li W, Wei W, Zhu S, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 16-9.

Liao J, Cui C, Chen S, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 11-5.

Knight J. GloFish casts light on murky policing of transgenic animals. *Nature* 2003; 426: 372.

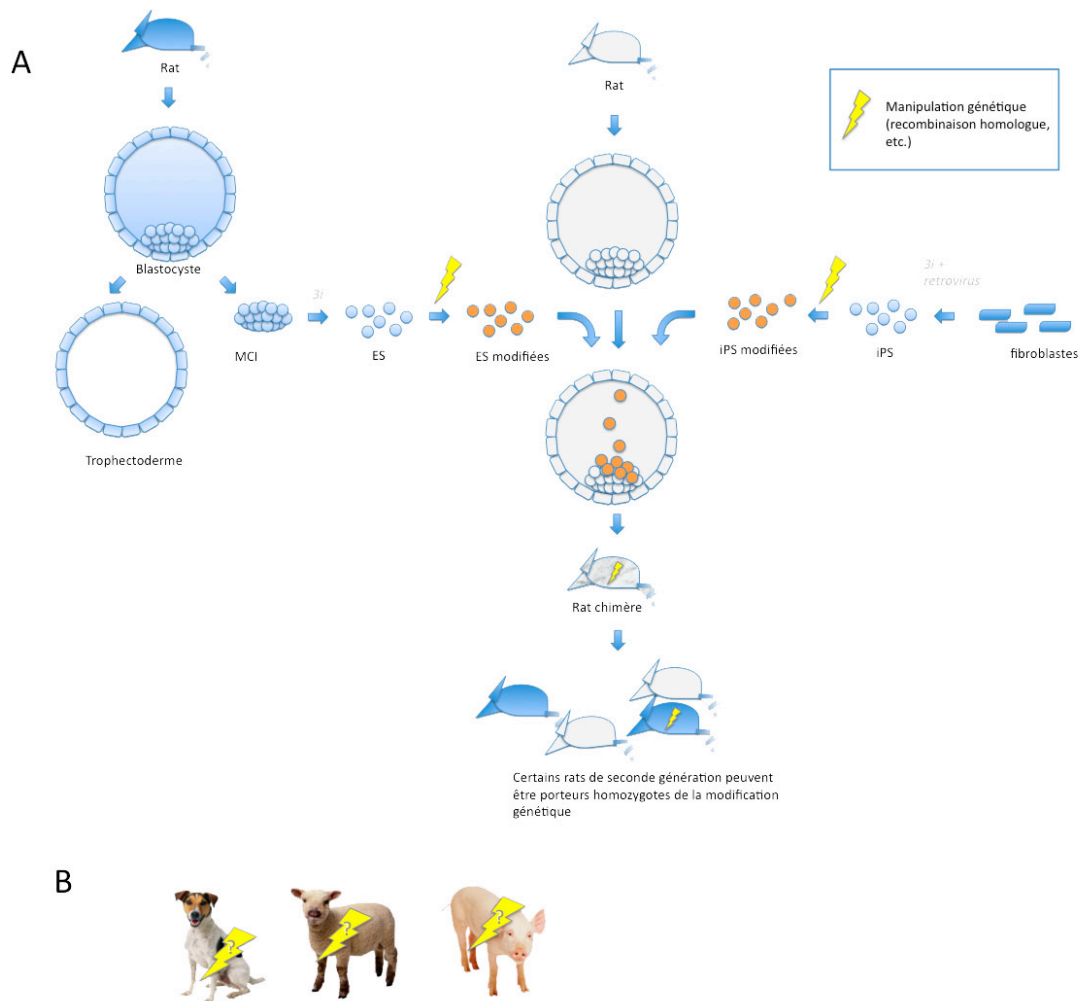


Figure : (A) La dérivation de lignées de cellules ES de rat est maintenant possible grâce à l'utilisation d'un cocktail de trois inhibiteurs chimiques « 3i ». Après manipulation génétique (recombinaison homologue ou autre), l'introduction des cellules pluripotentes (ES ou iPS) dans le blastocyste aboutit à des rats chimère dont certaines cellules, y compris germinales, peuvent être porteuses de la manipulation génétique. Après reproduction des rats chimères entre eux, certains animaux de seconde génération peuvent être homozygotes pour la modification génétique. (B) Grâce aux iPS, il est

concevable que cette technologie se décline dans l'avenir à d'autres animaux tels que chien, mouton ou porc, permettant la mise au point de modèle de pathologies humaines sur des gros animaux.