

M/S : médecine sciences



Nouvelles stratégies d'obtention des cellules souches embryonnaires

Derivation of embryonic stem cells

Philippe Taupin

Volume 22, Number 5, mai 2006

URI: <https://id.erudit.org/iderudit/013176ar>

[See table of contents](#)

Publisher(s)

SRMS: Société de la revue médecine/sciences
Éditions EDK

ISSN

0767-0974 (print)
1958-5381 (digital)

[Explore this journal](#)

Cite this document

Taupin, P. (2006). Nouvelles stratégies d'obtention des cellules souches embryonnaires. *M/S : médecine sciences*, 22(5), 478–480.

RÉFÉRENCES

1. Pearson D, Shively JE, Clark BR, et al. Urotensin II : a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 ; 77 : 5021-4.
2. Coulouarn Y, Lihmann I, Jégou S, et al. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 15803-8.
3. Conlon JM, Tostivint H, Vaudry H. Somatostatin- and urotensin II-related peptides : molecular diversity and evolutionary perspectives. *Regul Pept* 1997 ; 69 : 95-103.
4. Lihmann I, Bern HA, Vaudry H. Urotensin II and urotensin II-related peptide. In : Kastin AJ, ed. *Handbook of biologically active peptides*. Paris : Elsevier, 2006 ; 109 : 815-23.
5. Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, et al. Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ; 310 : 860-8.
6. Tostivint H, Lihmann I, Bucharles C, et al. Occurrence of two somatostatin variants in the frog brain : characterization of the cDNAs, distribution of the mRNAs, and receptor-binding affinities of the peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 12605-10.
7. de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, et al. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 1996 ; 381 : 242-5.
8. Tostivint H, Joly L, Lihmann I, et al. Comparative genomics provides evidence for close evolutionary relationships between the urotensin II and somatostatin gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 2237-42.
9. Olias G, Viollet C, Kusserow H, et al. Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem* 2004 ; 89 : 1057-91.
10. Conlon JM, Larhammar. The evolution of neuroendocrine peptides. *Gen Comp Endocrinol* 2005 ; 142 : 53-9.
11. Popovici C, Leveugle M, Birnbaum D, Coulier F. Coparalogy : physical and functional clusterings in the human genome. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 ; 288 : 362-70.
12. Kreienkamp HJ, Larusson HJ, Witte I, et al. Functional annotation of two orphan G-coupled receptors, Drostar1 and -2, from *Drosophila melanogaster* and their ligands by reverse pharmacology. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 39937-43.

NOUVELLE

Nouvelles stratégies d'obtention des cellules souches embryonnaires

Philippe Taupin

National Neuroscience Institute, Singapour.
National University of Singapour.
Nanyang Technological University, Singapour.
11Jalan Tan Tock Seng, 308433 Singapour.
obgpjt@nus.edu.sg

> Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont des cellules indifférenciées, qui prolifèrent *in vitro*, et ont le potentiel de se différencier dans tous les types cellulaires de l'organisme, suscitant, à ce titre, un intérêt thérapeutique. Les CSE sont dérivées de la masse cellulaire interne de blastocystes, nécessitant la destruction de ces derniers [1]. De ce fait, l'utilisation de lignées de CSE humaines existantes, et la production de nouvelles lignées chez l'homme sont soumises à une réglementation stricte (→) et se heurtent à certaines oppositions. Des études récentes tentent de répondre à ces limitations en proposant des stratégies d'obtention de CSE sans destruction des embryons. Y. Chung *et al.* rapportent l'établissement, chez la souris, de lignées de CSE à partir de blastomères - stade du développement où l'œuf ne comporte que 8 cellules - sans affecter la poursuite du développement des embryons [2]. Les lignées sont établies à partir d'un seul

(→)
m/s2003,
n° 6-7,
p. 683

blastomère, tandis que les embryons ne comportant plus que 7 cellules se développent normalement après implantation dans l'utérus. L'établissement de ces lignées nécessite l'agrégation des blastomères avec des CSE préexistantes. Ces dernières sont marquées avec la GFP (*green fluorescent protein*), ce qui permet de les distinguer des cellules issues du blastomère (exprimant *lacZ*). En l'absence d'un tel support cellulaire, les blastomères ne se divisent pas et se différencient. Après 2 à 4 jours en culture, les cellules dérivées de blastomères (non marquées à la GFP) se sont divisées et sont alors séparées des CSE fluorescentes, et cultivées selon les mêmes protocoles que les CSE. L'absence de contamination par les CSE « nourricières » est attestée par l'absence de transcrits codant pour la GFP, et par l'absence de fusion cellulaire. Les auteurs ont ainsi établi cinq lignées cellulaires de CSE qui possèdent les caractéristiques habituelles : pluripotentialité et capacité à former des tératomes chez

la souris. En particulier, après injection dans des blastocystes, elles participent à la formation de tous les tissus chez l'hôte, y compris les lignées germinales. Elles expriment également des marqueurs des CSE (Oct-4, SSEA-1). Des lignées trophoblastiques ont pu également être établies en cultivant les CSE en présence d'un facteur trophique, le FGF-4. Ces résultats démontrent que des cellules isolées de blastomères peuvent être utilisées pour dériver des lignées de CSE, une approche qui n'interfère pas avec le potentiel de développement de l'embryon. L'efficacité est cependant faible, puisque seules 12 lignées de CSE ont été dérivées à partir de 125 blastomères, alors que le taux d'efficacité est de 25 %-30 % à partir de blastocystes. Dans le cas du transfert nucléaire, et sans revenir sur le scandale récent de l'équipe coréenne dont la revue s'est faite l'écho (→), certaines des réticences et craintes concernaient la « création » artificielle d'un « embryon »,

(→) m/
s2006, n° 2,
p. 218



sa destruction et la dérive potentielle vers un clonage reproductif. Le transfert nucléaire consiste à isoler des noyaux de cellules somatiques, par exemple de fibroblastes, et à les introduire dans des ovocytes anucléés. Par des mécanismes inconnus, le cytoplasme des ovocytes reprogramme les chromosomes des noyaux des cellules somatiques, et l'œuf peut poursuivre son développement jusqu'au stade blastocyste, à partir duquel des lignées de CSE isogéniques peuvent être développées [3]. Afin de prévenir tout risque de développement de type « reproductif », W. Hurlbut propose une technique de « transfert nucléaire altéré » (TNA) [4]. Le concept du TNA repose sur l'inactivation d'un gène essentiel pour le développement du trophoctoderme, comme le gène *Cdx2* [5], ce qui empêche la formation de la barrière fœto-maternelle. Le TNA produit des blastocystes

incapables de s'implanter dans la paroi utérine, alors que leurs masses cellulaires internes sont intactes.

A. Meissner et R. Jaenisch ont récemment décrit un protocole pour dériver des lignées de CSE par TNA, chez la souris [6]. Les auteurs ont modifié génétiquement des fibroblastes de la peau, en insérant dans le génome, *via* un vecteur lentiviral, une cassette codant pour un ARN *cdx2* interférant et pour la GFP, flanquée de deux séquences *LoxP*. L'ARNi-*Cdx2*, la GFP, les séquences *LoxP* permettent respectivement l'inhibition du transcrite *Cdx2*, la sélection des fibroblastes transduits, et l'excision de la cassette ARNi-*cdx2* -*GFP in situ*, au moyen de la Cre-recombinase. Les noyaux des fibroblastes ainsi modifiés ont été transférés dans des ovocytes anucléés. A. Meissner et R. Jaenisch ont alors dérivé des lignées de CSE à partir des blastocystes résultant de cette manipula-

tion (61 blastocystes sur 526 ovocytes, et 14 % des blastocystes donnent des lignées ES). Ils ont également confirmé que ces derniers ne s'implantent pas dans la paroi utérine, et ne forment pas de trophoctoderme *in vitro*. Les CSE dérivées de ces blastocystes sont pluripotentes et, après leur implantation dans des blastocystes normaux, participent aux tissus des souriceaux nouveau-nés chimériques (à l'exception de l'intestin). Mais ces CSE sont incapables d'engendrer des blastocystes tétraploïdes lors d'expérience de fusion. Il est donc probable que le rôle du facteur de transcription *Cdx2* ne se limite pas à la formation du trophoctoderme, mais participe au développement de l'individu. Il est donc nécessaire de rétablir l'expression de *Cdx2*, afin de ne pas compromettre le potentiel des CSE dans lesquelles la protéine *cdx2* n'est pas produite. Pour cela, la délétion de la cassette ARNi-*Cdx2* est effectuée par la transfection d'un plasmide codant pour la Cre-recombinase, ce qui rétablit un potentiel de développement normal aux cellules ES. La pluripotentialité des CSE après action de la Cre-recombinase ne peut pas être confirmée *in vivo*, les cellules n'exprimant plus la GFP. Les auteurs ont ainsi démontré que les blastocystes déficients pour *Cdx2* ne forment pas de trophoctoderme fonctionnel et ne s'implantent pas dans la paroi utérine. Les CSE issues de ces clones conservent leur pluripotentialité, mais ne peuvent contribuer à un développement normal chez l'individu, du fait de la perte de l'activité de *Cdx2*. En revanche, après rétablissement de *Cdx2*, les CSE retrouvent leur potentiel. Ce travail démontre donc qu'il est possible d'inhiber la formation des annexes placentaires sans altérer la pluripotence de CSE. Sans minimiser la prouesse technique, R. Jaenisch souligne lui-même en conclusion que cette approche n'a pas d'application chez l'homme : elle ne répond pas au débat lié à la destruction de l'embryon, car avant l'expression de *cdx2*, l'embryon n'est pas fondamentalement anormal. D'autre part, nous ignorons tout du rôle de *cdx2* au cours du développement embryonnaire chez

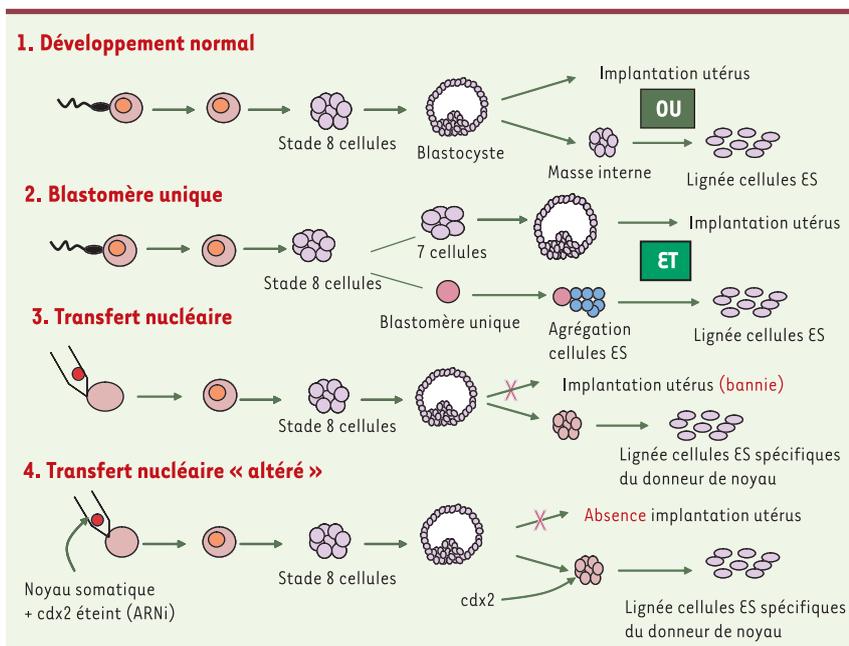


Figure 1. Différentes stratégies permettant d'obtenir des lignées de cellules ES pluripotentes.

1. Stratégie classique d'obtention de cellules ES à partir de la masse interne d'un blastocyste provenant des divisions d'un œuf fécondé. Il y a destruction du blastocyste (ce que symbolise le « OU »). **2.** Obtention de cellules ES à partir d'un blastomère unique prélevé au stade 8 cellules [2]. Cette stratégie permet l'obtention de cellules ES sans détruire le blastocyste (ce que symbolise le « ET »). **3.** Obtention de cellules ES par transfert du noyau d'une cellule somatique dans un ovocyte énucléé. **4.** Obtention de cellules ES par transfert d'un noyau modifié génétiquement de façon à rendre impossible l'implantation du blastocyste dans la membrane utérine et son développement normal [6] (adapté de [7]).

l'homme, et les nombreuses manipulations requises par l'extinction de *cdx2* et sa réexpression posent en elles-mêmes des problèmes éthiques difficiles. Quant à la technique proposée par Y. Chung, bien que l'isolement de blastomères soit pratiqué pour le diagnostic génétique préimplantatoire (DPI) dans les familles où il existe un risque de maladie génétique grave, leur capacité à établir des CSE n'est pas connue, et une telle démarche soulèverait aussi de très nombreuses questions [7-9]. ♦

Derivation of embryonic stem cells

REMERCIEMENTS

Je remercie D.J. Taupin pour la relecture de ce manuscrit. P.T. est supporté par des subventions du NMRC, BMRC, et de la Juvenile Diabetes Research Foundation.

RÉFÉRENCES

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282 : 1145-7 et 1827 (erratum).
2. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, et al. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 2006; 439 : 216-9.
3. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380 : 64-6.

4. Hurlbut WB. Altered nuclear transfer as a morally acceptable means for the procurement of human embryonic stem cells. *Perspect Biol Med* 2005; 48 : 211-28.
5. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 2005; 123 : 917-29.
6. Meissner A, Jaenisch R. Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts. *Nature* 2006; 439 : 212-5.
7. Weissman IL. Medicine : politic stem cells. *Nature* 2006; 439 : 145-7.
8. Melton DA, Daley GQ, Jennings CG. Altered nuclear transfer in stem-cell research - a flawed proposal. *N Engl J Med* 2004; 351 : 2791-2.
9. Solter D. Politically correct human embryonic stem cells ? *N Engl J Med* 2005; 353 : 2321-2.

NOUVELLE

Les mutations « gain de glycosylation »

Guillaume Vogt, Ariane Chappier, Nadia Chuzhanova, Jacqueline Feinberg, Claire Fieschi, Stéphanie Boisson-Dupuis, Alexandre Alcaïs, Laurent Abel, David N. Cooper, Jean-Laurent Casanova

► L'étude du syndrome de prédisposition mendélienne aux infections mycobactériennes (MIM 209950) a permis de mieux caractériser les mécanismes moléculaires de l'immunité anti-mycobactérienne chez l'homme. En effet, certains malades présentent une vulnérabilité héréditaire spécifique vis-à-vis des infections mycobactériennes [1-3]. Des études moléculaires ont montré qu'ils sont porteurs de mutations germinales dans cinq gènes participant aux voies d'activation cellulaire de l'interferon- γ (IFN- γ) ou de l'interleukine-12 (IL-12). Cela met en évidence le rôle indispensable de l'IFN- γ et de son principal inducteur l'IL-12 [4-10], dans le contrôle des infections mycobactériennes chez l'homme [11-13].

Nous avons récemment réalisé une étude sur trois enfants présentant des infections mycobactériennes disséminées chez lesquels nous avons trouvé une mutation faux sens T168N dans le gène *IFNGR2*.

Ils sont issus de deux familles consanguines, non apparentées entre elles. La première patiente est originaire d'Iran et a développé une infection disséminée à l'âge d'un mois après vaccination par le bacille de Calmette et Guérin (BCG, c'est-à-dire *M. bovis* atténué). Actuellement âgée de deux ans et demi, elle est toujours traitée par des antibiotiques antimycobactériens. Les deux autres malades sont deux frères originaires d'Arabie Saoudite qui avaient développé une infection disséminée à *M. fortuitum*; le premier est mort à l'âge de six ans, et le second, âgé de cinq ans, est toujours traité par des antibiotiques antimycobactériens.

Chez ces trois enfants, nous avons identifié un défaut complet de réponse à l'IFN- γ . Les explorations ont été effectuées sur sang total [14], lignées lymphocytaires B immortalisées par le virus Epstein-Barr et sur fibroblastes transformés par l'antigène T SV40 issus des

G. Vogt, A. Chappier, J. Feinberg, C. Fieschi, S. Boisson-Dupuis, A. Alcaïs, L. Abel : Laboratoire de Génétique humaine-Maladies infectieuses, Université René Descartes, Inserm U550, Faculté de Médecine Necker, 156, rue de Vaugirard, 75015 Paris, France. J.-L. Casanova : Laboratoire de Génétique humaine-Maladies infectieuses, Université René Descartes, Inserm U550, Faculté de Médecine Necker, 156, rue de Vaugirard, 75015 Paris, France. Département d'immunologie et d'hématologie pédiatrique, Hôpital Necker, 75015 Paris, France. French-Chinese Laboratory of Genomics and Life Sciences, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai, Chine. N. Chuzhanova : Biostatistics and Bioinformatics Unit and Institute of Medical Genetics. D.N. Cooper : Institute of Medical Genetics. Cardiff University, Cardiff CF14 4XN, Royaume-Uni. C. Fieschi : Département d'Immunopathologie, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France. vogt@necker.fr

patients. La même mutation homozygote T168N du gène *IFNGR2* a été retrouvée chez ces trois patients. Puis, par des