



(11)

EP 1 149 899 B9

(12) **FASCICULE DE BREVET EUROPEEN CORRIGE**

(15) Information de correction:

Version corrigée no 1 (W1 B1)

Corrections, voir

Description **Paragraphe(s) 3, 14, 25, 28, 43,**
47, 57, 61, 66, 74, 77, 78, 81, 82

Revendications FR 12

(51) Int Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/00 (2006.01)

(48) Corrigendum publié le:

21.09.2011 Bulletin 2011/38

(45) Date de publication et mention
de la délivrance du brevet:

23.02.2011 Bulletin 2011/08

(21) Numéro de dépôt: **01108584.2**

(22) Date de dépôt: **20.10.1995**

(54) **Milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires**

Kulturmedium für totipotente embryonale Vogelzellen

Culture medium for avian totipotent embryonic cells

(84) Etats contractants désignés:

AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL
PT SE

(30) Priorité: **21.10.1994 FR 9412598**

(43) Date de publication de la demande:

31.10.2001 Bulletin 2001/44

(62) Numéro(s) de document de la (des) demande(s)
initiale(s) en application de l'article 76 CBE:

95935994.4 / 0 787 180

(73) Titulaires:

- **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE**
AGRONOMIQUE
75007 Paris (FR)
- **CENTRE NATIONAL DE**
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
75794 Paris Cedex 16 (FR)
- **ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON**
69007 Lyon (FR)

(72) Inventeurs:

- **Samarut, Jacques**
69100 Villeurbanne (FR)

- **Pain, Bertrand**
69003 Lyon (FR)

(74) Mandataire: **Warcoin, Jacques et al**
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
75847 Paris Cedex 17 (FR)

(56) Documents cités:

WO-A-90/01541 WO-A-93/15185
WO-A-93/23528 WO-A-94/03585
US-A- 5 453 357

- **DATABASE BIOSIS [en ligne] BIOSCIENCES**
INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA,
US; 1994 HUANG SHIANG ET AL: "Lymphoid and
myeloid differentiation of single human CD34+,
HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells."
Database accession no. PREV199497184772
XP002176825 & BLOOD, vol. 83, no. 6, 15 mars
1994 (1994-03-15), pages 1515-1526, ISSN:
0006-4971

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la publication de la mention de la délivrance du brevet européen au Bulletin européen des brevets, toute personne peut faire opposition à ce brevet auprès de l'Office européen des brevets, conformément au règlement d'exécution. L'opposition n'est réputée formée qu'après le paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

EP 1 149 899 B9

- DATABASE BIOSIS [en ligne] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1987 SMITH A G ET AL: "BUFFALO RAT LIVER CELLS PRODUCE A DIFFUSIBLE ACTIVITY WHICH INHIBITS THE DIFFERENTIATION OF MURINE EMBRYONAL CARCINOMA AND EMBRYONIC STEM CELLS" Database accession no. PREV198784023147 XP002176826 & DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 121, no. 1, 1987, pages 1-9, ISSN: 0012-1606
- DATABASE BIOSIS [en ligne] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1993 SLAGER H G ET AL: "Transforming growth factor-beta in the early mouse embryo: Implications for the regulation of muscle formation and implantation." Database accession no. PREV199396074345 XP002176827 & DEVELOPMENTAL GENETICS, vol. 14, no. 3, 1993, pages 212-224, ISSN: 0192-253X
- R.IAN FRESHNEY: "SECONDE EDITION. CULTURE OF ANIMAL CELLS. A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE", ALAN R. LISS, INC., NEW YORK XP002176824 * page 187 - page 196 *
- DATABASE BIOSIS [en ligne] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1994 YANG Z ET AL: "Use of Avian Cytokines in Mammalian Embryonic Stem Cell Culture." Database accession no. PREV199497372027 XP002176828 & POULTRY SCIENCE, vol. 73, no. 7, 1994, pages 965-974, ISSN: 0032-5791
- DATABASE BIOSIS [en ligne] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1994 KAWASE EI HACHIRO ET AL: "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture." Database accession no. PREV199497136915 XP002176829 & DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 161, no. 1, 1994, pages 91-95, ISSN: 0012-1606
- KAWASE E. ET AL: 'Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) Stimulates Proliferation of Mouse Primordial Germ Cells in Culture' DEVELOPMENTAL BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US LNKD- DOI: 10.1006/DBIO.1994.1011 vol. 161, no. 1, 01 Janvier 1994, pages 91 - 95, XP024779794 ISSN: 0012-1606
- MATSUI Y. ET AL: 'Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture' CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US LNKD- DOI: 10.1016/0092-8674(92)90317-6 vol. 70, no. 5, 04 Septembre 1992, pages 841 - 847, XP024245512 ISSN: 0092-8674

Description

[0001] La présente invention se rapporte à l'obtention de cellules ES aviaires, en particulier à un procédé de culture et à un milieu permettant la culture de ces cellules.

[0002] En effet, dans le cadre de la mise au point de technique de production de protéines recombinantes, le développement d'une technique de transgénèse chez les oiseaux domestiques aura des retombées économiques extrêmement importantes dans deux applications majeures:

- 1. le développement de souches aviaires présentant des caractères génétiques déterminés (résistance à certaines maladies, performances de croissance, etc)
- 2. le développement de systèmes de production de protéines recombinantes dans l'albumen de l'oeuf.

[0003] L'industrie biotechnologique s'intéresse de plus en plus à la possibilité de produire des protéines d'intérêt dans des fluides biologiques ou des organismes (sang, lait, plantes, ...). La production de telles protéines dans l'oeuf d'oiseau domestique constituera certainement dans cette voie une avancée technologique majeure pour plusieurs raisons:

- de nombreuses protéines de mammifères ne peuvent être produites en système mammifère car leur surabondance dans ces organismes présente des effets délétères (exemple: l'érythropoïétine qui chez le lapin induit des hyperglobulinémies pathologiques). Beaucoup de ces protéines d'intérêt ne présentent pas d'activité croisée avec celles des oiseaux, autorisant ainsi leur surproduction dans un organisme aviaire sans effet pathologique majeur;
- il est très vraisemblable que la commercialisation de protéines recombinantes produites chez des mammifères se heurtera à des problèmes sanitaires liés à la présence chez cette espèce d'organismes latents potentiellement pathogènes pour l'Homme (lentivirus, prions,...). Ce risque est très minime, pour ne pas dire quasiment inexistant, pour des agents pathogènes des oiseaux domestiques;
- l'oeuf constitue un "tissu" très dense en un petit nombre de protéines. Par exemple la protéine majeure de l'oeuf d'oiseau, l'ovalbumine représente 54 % des protéines du blanc d'oeuf, soit un poids sec moyen par oeuf de 2 grammes de matière sèche environ. On peut raisonnablement imaginer produire par oeuf au moins 10% de cette masse en protéine recombinante. La rentabilité économique apparaît très grande si l'on considère qu'une poule pond en moyenne 2 oeufs tous les trois jours, et cette rentabilité apparaît très supérieure à celle de grands mammifères si l'on considère les coûts d'élevage bien moindres des oiseaux domestiques.

[0004] La réalisation d'oiseaux transgéniques est possible actuellement avec un coût extrêmement élevé à cause de sa très faible efficacité. En effet chez les oiseaux la technique de microinjection d'ADN dans l'oeuf est quasiment impossible. D'autre part l'utilisation du système des rétrovirus vecteurs, le seul système efficace à ce jour, reste complexe et se heurtera certainement à une réticence de la part des industriels pour des raisons sanitaires.

[0005] Une avancée très importante à la réalisation d'animaux transgéniques a été apportée chez la souris par le développement de la technologie des cellules ES.

[0006] Les cellules ES (pour Embryonic Stem cells) sont des cellules embryonnaires totipotentes capables de régénérer tous les tissus de l'embryon, y compris le tissu germinale, après leur injection dans des embryons très précoces. Ces cellules peuvent donc être considérées comme des chevaux de Troie pour introduire de nouvelles informations génétiques dans le patrimoine génétique d'un animal. La possibilité de cultiver ces cellules à long terme in vitro, offre la possibilité d'exercer de nombreux contrôles avant leur implantation in vivo. D'autre part ces cellules peuvent être conservées de façon illimitée dans l'azote liquide, ce qui constitue une possibilité de stockage d'un patrimoine génétique.

[0007] L'utilisation de cellules ES constitue aujourd'hui chez les oiseaux domestiques la voie la plus prometteuse pour la réalisation efficace d'animaux transgéniques.

[0008] La Demande WO 93/23528 divulge un milieu de culture pour les cellules ES aviaires qui contient de *LIF*. (Leukemia Inhibitory Factor).

Des travaux récents d'un groupe canadien (R. Etches à la station de Guelph) ont suggéré que des cellules ES doivent exister dans l'embryon d'oiseau (Petitte et al., 1990). Ce groupe a réussi la transplantation de telles cellules dans des embryons, et par suite, la production d'animaux dont le patrimoine génétique est dérivé des cellules greffées. Cependant à ce jour la culture de ces cellules in vitro n'a pas pu être réussie; par conséquent ces cellules n'ont pas pu être utilisées pour transférer de façon stable un transgène. C'est là un blocage majeur à l'exploitation de la technologie des cellules ES chez les oiseaux. Les cellules ES peuvent être caractérisées par trois types de critères essentiels:

- morphologie
- activité phosphatase alcaline endogène
- réaction avec des anticorps spécifiques d'un état de totipotence (ECMA-7, SSEA-1 et SSEA-3 notamment).

[0009] Aucune culture de cellules ES identifiées par l'ensemble de ces caractéristiques n'a pu être obtenue à ce jour.

[0010] C'est pourquoi la présente invention a pour objet un milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires du type comportant un milieu de culture pour cellules aviaires .

[0011] Le cas échéant, le milieu de culture est substantiellement dépourvu d'acide rétinoïque actif.

5 **[0012]** De manière avantageuse, l'acide rétinoïque est substantiellement inactivé par des anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA) présents dans le milieu.

[0013] En effet, les milieux employés contiennent souvent du sérum, dont on ne peut contrôler la quantité endogène d'acide rétinoïque. En testant l'effet de l'incorporation au milieu de culture d'un anticorps monoclonal anti-acide rétinoïque qui neutraliserait l'action de ce dernier, sur la différenciation des cellules, la Demanderesse a constaté que la présence

10 de cet anticorps accroît la présence dans les cultures de cellules et colonies à activité phosphatase alcaline.

[0014] plus spécifiquement, la présente invention a pour objet un

Procédé de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires (ou cellules ES aviaires), caractérisé en ce que :

15 1) On met en suspension des cellules provenant de disques biastodermiques d'oeufs d'oiseau fécondés dans un milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires, du type comportant un milieu de culture pour cellules aviaires, comprenant :

20 a) b-FGF, SCF et LIF, ou
b) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF, IL-11, IL-6, et IGF-1, ou
c) b- FGF, aSCF (avian SCF), LIF et IGF-1.
(bFGF= basic Fibroblast Growth Factor ; SCF=Stem Cell Factor ; LIF=Leukemia Inhibitory Factor ; IL 11= Interleukine 11; IL6 = Interleukin 6 ; IGF-1 = Insulin-like Growth Factor -1 ; aSCF = avian Stem Cell Factor)

25 2) Onensemence un tapis de cellules nourricières avec la suspension obtenue à l'issue de l'étape a),
3) On met les cellules à incuber,
4) Les cellules en culture sont prélevées et purifiées afin de récupérer des cellules ES aviaires.

30 Avantageusement, dans le procédé de culture selon l'invention entre les étapes 3) et 4), on effectue une ou plusieurs additions échelonnées dans le temps, de milieu neuf identique à celui utilisé dans l'étape 1).

Avantageusement, dans le procédé de culture selon l'invention le milieu de culture est essentiellement dépourvu d'acide rétinoïque actif.

35 Avantageusement, dans le procédé de culture selon l'invention le milieu de culture comporte un tapis de cellules nourricières.

Avantageusement, dans le procédé de culture selon l'invention entre les étapes 3) et 4), on effectue l'addition de milieu neuf au 3^{ème} jour, puis tous les jours.

40 Avantageusement, dans le procédé de culture selon l'invention l'étape 4) est effectuée par traitement enzymatique, lavage dans un milieu ne contenant pas de facteur de croissance et centrifugation.

45 Avantageusement, dans le procédé de culture selon l'invention **à l'issue de** l'étape 4), on effectue une étape 5) dans laquelle, les cellules ES sont réensemencées sur un tapis de cellules nourricières. en présence dudit milieu de culture, de manière à obtenir une culture secondaire.

Avantageusement, dans le procédé de culture selon l'invention les étapes 4) et 5) sont répétées plusieurs fois.

50 Avantageusement, dans le procédé de culture selon l'invention, entre les étapes 3) et 4) on effectue une ou plusieurs additions échelonnées dans le temps, le milieu neuf identique à celui utilisé dans l'étape 1).

Avantageusement, dans le procédé de culture selon l'invention au cours de l'étape 3), on effectue un réensemencement du milieu par une suspension de cellules identique à la suspension préparée à l'étape 1).

55 **[0015]** Le milieu de l'étape 1) contient de préférence les éléments suivants:

b-FGF, a-SCF, IGF-1, LIF, IL-11, IL-6 et anticorps anti-acide rétinoïque.

Selon l'un des aspects de l'invention, il contient en outre les composés suivants :

- Sérum foetal de bovin.
 - Sérum de poule
 - Conalbumine
 - Acides aminés non essentiels
 - Pyruvate de sodium
 - Stock de nucléosides
 - Hepes (1M)
 - β -mercaptoéthanol
 - Penicilline
 - Streptomycine
 - Gentamycine
- avec le stock de nucléosides constitué du mélange :

adénosine, guanosine, cytidine, uridine et thymidine en solution aqueuse.

[0016] De manière facultative, au cours du procédé selon l'invention, on effectue entre les étapes 3) et 4) l'addition de milieu neuf au 3^{ème} jour puis le milieu est changé tous les jours jusqu'au prochain repiquage.

[0017] L'étape 4) peut notamment être effectuée par traitement enzymatique, lavage dans un milieu ne contenant pas de facteur de croissance et centrifugation.

[0018] On peut recueillir directement les cultures primaires de cellules, qui seront ensuite congelées, ou bien réaliser des cultures secondaires successives à partir des cellules de la culture primaire. Dans ce cas, à l'issue de l'étape 4), on effectue une étape 5) dans laquelle, les cellules ES sont réensemencées sur un tapis de cellules nourricières. ou sur boîtes gélatinées, de manière à obtenir une culture secondaire.

[0019] Les étapes 4) et 5) peuvent être répétées plusieurs fois pour avoir des cultures tertiaires et successives.

[0020] Le tapis de cellules nourricières peut être constitué de différents types de cellules décrits précédemment, notamment de cellules STO mitomycinées ou irradiées.

[0021] Un autre des objets de l'invention est une culture de cellules ES aviaires, susceptibles d'être obtenues par le procédé de culture selon l'invention défini ci-dessus et comme défini par la revendication 9. Une cellule embryonnaire totipotente aviaire modifiée peut être obtenue par intégration du gène codant pour une protéine hétérologue dans le génome d'une cellule ES aviaire en culture.

[0022] La présente invention a également pour objet une Culture de cellules ES aviaires in vitro susceptible d'être obtenue par le procédé de culture selon l'invention ; ladite culture comprenant un milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires comprenant :

a) b-FGF, SCF et LIF, ou

b) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF, IL-II, IL-6, et IGF-1, ou

c) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF et IGF-1.

(bFGF= basic Fibroblast Growth Factor ; SCF=Stem Cell Factor ; LIF=Leukemia Inhibitory Factor ; IL 11= Interleukine 11 ; IL6 = Interleukin 6 ; IGF-1 = Insulin-like Growth Factor -1 ; aSCF = avian Stem Cell Factor)

Avantageusement la Culture de cellules ES aviaires selon invention présente 2 à 3 fois plus de colonies positives pour l'activité alcaline phosphatase par rapport au fond constitué en majorité de cellules faiblement positives.

Avantageusement, dans la culture de cellules ES aviaires selon l'invention les cellules réagissent spécifiquement avec au moins un anticorps sélectionné parmi ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 et EMA-6.

Avantageusement, dans la culture de cellules ES aviaires selon l'invention les cellules ne réagissent pas avec l'anticorps TROMA-1.

Avantageusement, dans la culture de cellules ES aviaires selon l'invention les cellules sont modifiées par intégration du gène codant pour une protéine hétérologue.

[0023] Le facteur de croissance des cellules souches (ou SCF) est de préférence l'a-SCF (ou avian Stem Cell Factor) et le m-SCF (ou murine Stem Cell Factor).

[0024] L'un des aspects préférés de l'invention concerne un milieu de culture qui contient, outre les éléments nutritifs de base nécessaires à la croissance de cellules, une combinaison de b-FGF, SCF et LIF. En outre, la présence dans

le milieu d'un anticorps monoclonal neutralisant l'activité de différenciation exercée par l'acide rétinoïque augmente le nombre de cellules souches embryogènes totipotentes.

[0025] La présence d'un tapis de cellules nourricières favorise la croissance de cellules ES aviaires. Divers type de cellules connues de l'homme du métier peuvent-être utilisées : on peut citer en particulier des cellules telles que les cellules STO, traitées à la miromycine ou irradiées, les cellules BRL-3A, les cellules LMH, les cellules QT6 et cellules QT6 modifiées telles que les cellules QT6 isolde, les cellules différenciées établies en lignée à partir des cultures de cellules souches embryonnaires induites à différencier.

[0026] Les cellules STO sont des fibroblastes d'embryons de souris (catalogue ATCC) : les cellules BRL-3A (catalogue ATCC) sont des cellules de foie de "Buffalo rat liver". Les cellules QT6 (catalogue ATCC) et cellules QT6 modifiées telles que les cellules QT6 isolde sont des fibroblastes de caille (Cosset et col., 1990, J. Virol. 64, 10170-1078) et les cellules LMH proviennent de carcinome de foie de poulet (Kawagucchi et col., 1987, Cancer Res., 47, 4460-4464).

[0027] Le milieu de culture contient en outre différents éléments nutritifs essentiels et des antibiotiques.

[0028] Un milieu de culture particulièrement adapté à la présente invention possède la composition suivante :

BHK-21	
Sérum foetal de bovin	10%
Sérum de poulet	2%
Conalbumine	20 ng/ml
Acides aminés non essentiels	1%
Pyruvate de sodium	1 mM
Nucléosides stock	1%
Hepes (1M)	10 mM
β-mercaptoéthanol	-0,2 mM
Penicilline	100 U/ml
Streptomycine	100 µg/ml
Gentamycine	10 ng/ml

Additifs:

[0029]

Final

bFGF	de 1 à 20 ng/ml
a-SCF	de 0,5% à 296 vol SN de COS/vol
IGF-1	de 5 à 50 ng/ml
LIF	de 1000 à 5000 U/ml de forme purifiée soit environ de 0.1% à 2% vol/vol de surnageant de culture de cellules COS transfectées
IL-6	de 5 à 50 ng/ml (environ de 0.1% à 2% vol/vol de surnageant de culture de cellules COS transfectées)
IL-11	de 5 à 50 ng/ml (environ de 0.1% à 2% vol/vol de surnageant de culture de cellules COS transfectées)

[0030] De manière avantageuse la concentration en bFGF est supérieure à 5 ng/ml et la concentration en IGF-1 est supérieure à 10 ng/ml.

avec le stock de nucléosides constitué du mélange :

adénosine	80 mg
guanosine	85 mg
cytidine	73 mg
uridine	73 mg
thymidine	24 mg
H ₂ O	100 ml

et SN de Cos représentant un surnageant de culture de cellules COS-7 transfectées en expression transitoire avec un vecteur d'expression du cDNA du facteur considéré, et convient à la culture de cellules embryonnaires totipotentes d'oiseau.

[0031] Le milieu BHK21 (ou milieu MEM) est un milieu de culture qui a été décrit notamment par Mc Pherson, I., et Stoker (1962, Virology 16, 147).

[0032] Hepes est de l'hydroxy-éthyl-pipérazine-éthane-sulfonate.

[0033] Enfin, un procédé de production d'une protéine recombinante, caractérisé en ce qu'on intègre le gène codant pour ladite protéine dans le génome d'une cellule embryonnaire totipotente aviaire en culture est divulgué.

[0034] La Demanderesse a mis au point un milieu de culture et des conditions de culture in vitro permettant de maintenir en culture des cellules aviaires qui présentent des propriétés morphologiques, cinétiques et histochimiques rappelant celles des cellules embryonnaires totipotentes. Ces observations ont été effectuées aussi bien avec des cellules dérivant de disques blastodermiques de caille que de poulet. La croissance de ces cellules en culture in vitro est rendue possible par la mise au point d'un milieu original spécialement adapté à la culture de cellules embryonnaires d'oiseau. On sait que la présence, le maintien et la propagation de cellules totipotentes en culture permettent leur injection dans des embryons receveurs. La contribution à la morphogenèse des tissus somatiques et germinaux chez les animaux receveurs grâce à un caractère totipotent, peut conduire à l'obtention d'animaux transgéniques.

[0035] Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée. Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

Figure 1: Effet des combinaisons de facteurs

- blastoderms de caille, 0,75 bl/ml
- fond de gélatine
- culture de 3 j

Figure 2: effet de l'anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA)

- blastoderms de caille, 0,75 bl/ml
- fond avec ou sans gélatine
- culture de 4 j

Figure 3: comparaison de différentes cytokines

- blastoderms de caille, 2 bl/ml
- fond avec gélatine
- culture de 2 + 3 j

Figure 4: Comparaison d'un ensemencement sur gélatine et sur tapis de cellules traitées à la mitomycine C en présence de différentes cytokines appartenant toutes à la même famille.

4A: - blastoderms de caille, 1+1,5 bl/ml

- fond avec gélatine
- culture de 3 + 4 j

4B: - blastoderms de caille, 1+1,5 bl/ml

- fond avec cellules STO
- culture de 3 + 4 j

Figure 5: Activité phosphatase alcaline et reconnaissance par ECMA-7

- blastoderms de caille, 1,5 bl/ml
- fond avec cellules STO
- culture de 2 + 3 j

Figure 6: Activité phosphatase alcaline et reconnaissance par NC-1

- blastoderms de caille, 1,5 bl/ml
- fond avec cellules STO
- culture de 2 + 3 j

Figure 7 : Animaux chimères obtenus par injection in ovo dans des embryons de cellules maintenues en culture. Cellules injectées après 8 ou 10 jours de culture.

Matériel et méthodes

Préparation des cellules

[0036] Les oeufs de poules fraîchement pondus, non incubés, correspondent au stade X de développement (Eyal Giladi and Kovak, 1976) ; les oeufs de caille " *C. coturnix japonica* " sont également utilisés dès la ponte et non incubés.

[0037] Le disque blastodermique (3-4 mm de diamètre pour la poule, 2-2,5 mm pour la caille) est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur dans du milieu complet sans facteurs. Les cellules sont centrifugées à 200 g, lavées deux fois dans du milieu afin d'éliminer le maximum de vitellus contaminant, resuspendues à raison de 2 disques pour 1 ml de milieu et dissociées mécaniquement par passage dans une aiguille de 23 G. Les facteurs sont alors ajoutés.

[0038] La suspension cellulaire est déposée:

- soit sur boîtes ou puits (Costar) préalablement gélatinés (0,2 % gélatine, 1 h à t° ambiante),
- soit sur un tapis de cellules STO préalablement traitées à la mitomycine C (90 min, 37°C, 5 µg/ml) et ré-ensemencées à raison de 10⁵ cellules / cm²,
- soit sur un tapis de cellules isolde préalablement traitées à la mitomycine C (90 min, 37°C, 5 µg/ml) et ré-ensemencées à raison de 10⁵ cellules / cm².

Milieu de culture STO :

[0039]

		final
	DMEM	
	Sérum foetal Bovin	10%
	Pénicilline	100 U/ml
	Streptomycine	100 µg/ml
	L-Glutamine	2 mM

Milieu de culture Isolde :

[0040]

		final
	DMEM	
	Sérum foetal Bovin	8 %
	Sérum de poulet	2 %
	Penicilline	100 U/ml
	Streptomycine	100 µg/ml
	G418	100 µg/ml
	Hygromycine	50 µg/ml
	Phléomycine	50 µg/ml
	TBP (bouillon tryptose phosphate)	10%

[0041] Les drogues de sélection sont ajoutées en entretien mais enlevées deux jours avant le traitement à la mitomycine C.

[0042] Dans tous les cas, un second ensemencement est réalisé dans les mêmes conditions après deux jours de culture.

Cultures

[0043] Les cultures sont incubées à 37 °C ou à 41 °C, dans une atmosphère contrôlée en CO₂ (7,5 %) et leur évolution

EP 1 149 899 B9

est suivie au microscope en contraste de phase. Une addition partielle (50 %) de milieu neuf avec les facteurs est réalisée le 3^{ème} jour de culture, puis le milieu est changé tous les jours. A chaque moment, les cellules en croissance peuvent être soit fixées pour étude, soit prélevées pour être ré-ensemencées en culture secondaire ou supérieure, sur tapis de cellules STO mitomycinées irradiées ou sur boîtes gélatinées.

[0044] En cas de fixation, les cellules sont lavées en Tris-Glucose deux fois, puis fixées in situ 15 min dans une solution de paraformaldéhyde 4 % à froid (0-4 °C). Après plusieurs lavages au PBS, différentes colorations peuvent être réalisées selon l'un des protocoles suivants :

* détection de l'activité phosphatase alcaline endogène,

tampon de réaction:	NaCl	100 mM
	Tris HCl pH 9.5	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
	NBT	1 mg/ml
	BCIP	0.1 m/ml
	H ₂ O	
(temps de lecture de 5 à 30 min, 37°C)		

** détection de l'activité de β-galactosidase exogène

tampon de réaction:	Ferricyanure de K	5 mM
	Ferrocyanure de K	5 mM
	MgCl ₂	5 mM
	X-gal	1 mg/ml
	PBS	
(temps de lecture, de 1 à 2heures, 37°C)		

*** détection par immunocytochimie de la présence d'épitopes spécifiques (réaction à 4°C)

blocage en tampon PBS - BSA (1 mg/ml)

lavage en PBS - BSA

anticorps primaire 1/10ème ou 1/50ème

anticorps secondaire fluorescent 1/ 50ème la détection est réalisée sous microscope inversé à fluorescence.

Repiquage

[0045] En cas de passage en culture secondaire ou successive, les cellules sont lavées en Tris-Glucose deux fois, puis incubées 10-30 min dans une solution enzymatique. On peut utiliser une solution de collagénase-dispase (1 mg/ml soit 1 U/ml final) à laquelle une solution de hyaluronidase (1 mg/ml final soit 1 U/ml) peut être ajoutée : on peut également utiliser une solution de pronase à 0.25 mg/ml final. Les cellules ou les petits amas de cellules ainsi isolés enzymatiquement sont lavées en milieu ESA, resuspendus, déposés sur un coussin de milieu de séparation de lymphocyte de densité (d= 1,077-1,080) et centrifugés 20 min à t° ambiante à 800 g afin de débarasser les cellules non différenciées de blastoderms des cellules du tapis, des débris divers et des restes de vitellus contaminants. L'interface est alors prélevée, lavée deux fois en milieu ESA. Le culot cellulaire obtenu est resuspendu et dissocié légèrement mécaniquement avant d'être ensemencé sur un nouveau tapis de cellules nourricières, comme précédemment décrit. L'équivalent de 6 disques blastodermiques initiaux est ré-ensemencé dans 2 ml. Cette étape de gradient n'est parfois pas nécessaire lors des passages successifs, en fonction de la très grande homogénéité des cultures obtenues.

[0046] Les cellules dissociées peuvent être déposées sur un gradient multicouche de Percoll et centrifugées dans les mêmes conditions. Les interfaces sont alors prélevées, lavées dans un milieu ESA et les cellules les plus immatures des interfaces supérieures réensemencées, ou injectées dans des embryons receveurs.

Congélation

[0047] A l'issue de la culture primaire ou successive, les cellules récupérées de gradient peuvent être congelées dans un mélange constitué de 40 % FBS, 50 % milieu ESA et 10 % DMSO. Les cellules équivalant à 24 blastodisques initiaux sont reprises dans 0,5 ml de milieu ESA, resuspendues et 0,4 ml de serum est ajouté. 0,1 ml de DMSO est alors ajouté très lentement. La suspension de congélation est répartie dans des tubes à congélation (0,5 ml/tube) et congelée

EP 1 149 899 B9

lentement à -80 °C avant d'être transférée dans l'azote liquide.

Résultats

- 5 **[0048]** Un milieu de base appelé milieu "ESA" pour "Embryonic Stem cells Avian" dérivant d'un milieu utilisé pour les cellules ES murines a été préparé. Il présente la composition suivante :

Milieu "ESA":

10 **[0049]**

		final
	BHK-21	
15	Foetal Bovine Serum	10%
	Serum de poulet	2%
	Conalbumine	20 ng/ml
	Acide Aminés non essentiels	1%
	Pyruvate de sodium	1mM
20	Stock de nucléosides	1%
	Hepes (1M)	10 mM
	β-mercaprocthanol	0.2 mM
	Penicilline	100 U/ml
25	Streptomycine	100 µg/ml
	Gentamycine	10 ng/ml

- 30 **[0050]** A ce milieu de base "ESA", des facteurs de croissance ont été ajoutés afin de comparer leur contribution respective à la formation de colonies présentant un caractère morphologique et biochimique intéressant. Leurs concentrations sont indiquées ci-après :

Additifs:

[0051]

		stock	final
35	bFGF	10 µg/ml	10 ng/ml
	a-SCF	SN de Cos trans*	1 % vol/vol
	IGF-1	10 µg/ml	20 ng/ml
40	LIF	SN de Cos trans*	1 % vol/vol
	IL-11	10 µg/ml	10 ng/ml
	IL-6	10 µg/ml	10 ng/ml
	ARMA	10 mg/ml	1 µg/ml
45	OSM	20 µg/ml	20 ng/ml
	CNTF	20 µg/ml	20 ng/ml

stock de nucléosides

50 **[0052]**

	adénosine	80 mg
	guanosine	85 mg
55	cytidine	73 mg
	uridine	73 mg
	thymidine	24 mg

(suite)

H ₂ O	100ml
* surnageant de culture	
de cellules COS-7	
transfectées en	
expression transitoire	
avec un vecteur	
d'expression du cDNA du	
facteur considéré.	

[0053] Le premier critère utilisé pour évaluer l'effet de ces facteurs et des modifications apportées au milieu a été la détection par coloration biochimique de l'activité phosphatase alcaline endogène qui semble spécifique d'un certain nombre de cellules telles que les cellules ES totipotentes, les cellules précurseurs dérivées de la lignée germinale et certaines cellules différenciées, facilement identifiables à leur morphologie épithélioïde.

[0054] Les cellules des disques blastodermiques sontensemencées en milieu ESA en présence de différentes combinaisons de facteurs. Après 3 j de culture, les cellules sont fixées, colorées et les colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline (AP+) sont dénombrées.

[0055] L'effet des différentes combinaisons de facteurs est représenté sur la figure 1.

Conclusion

[0056] Parmi les facteurs testés, la combinaison du SCF (Stem Cell Factor d'origine murine -mSCF- ou aviaire -aSCF-), du b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor) et du LIF (Leukemia Inhibitory Factor) donne le meilleur nombre de colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline dans les cultures avec un accroissement de 2-3 fois par rapport à la présence de chaque facteur ajouté individuellement ou deux par deux et par rapport au fond, constitué en majorité de cellules faiblement positives et présentant une morphologie épithélioïde différenciée.

II) Effet de l'anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA)

[0057] Les cellules sontensemencées soit sur boîtes non traitées, soit traitées à la gélatine dans du milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic- Fibroblast Growth factory, IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et LIF (Leukemia Inhibitory factor). L'anticorps ARMA est ajouté à raison de 1 µg/ml final. Les cellules et colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline (AP +) sont dénombrées après.4 j de culture.

[0058] Les résultats sont représentés sur la figure 2.

[0059] Comparativement aux différents moyens décrits comme l'utilisation de résine ou de charbon, et testés pour essayer de contrôler le niveau d'acide rétinoïque dans le milieu, l'addition de l'anticorps anti acide rétinoïque dans le milieu donne les meilleurs résultats quant à la qualité et la quantité des colonies présentes dans les cultures

Conclusion

[0060] L'addition de l'anticorps anti-acide rétinoïque dans le milieu de culture accroît de façon notable la présence et /ou le maintien des colonies à activité phosphatase alcaline.

III) Effet des cytokines

[0061] Nous avons voulu vérifier si le LIF ou d'autres cytokines de la même famille pouvait induire la prolifération des cellules ES chez l'oiseau.

[0062] Les cellules sontensemencées en milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic- Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-I en présence d'ARMA (1 µg/ml) et après addition ou non de différentes cytokines de la même famille LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukine 11) et IL-6 (Interleukine 6). Afin d'accroître l'adhésion et la formation de colonies phosphatase alcaline positives ainsi que leur taille, un second ensemencement a lieu 2 jours après le premier. La fixation, coloration et lecture des colonies a eu lieu 3 jours après le second ensemencement.

[0063] La comparaison de l'effet des différentes cytokines est représentée sur la figure 3.

Conclusion

[0064] Le rôle des cytokines LIF, IL-11 et IL-6 semble particulièrement prononcé et pratiquement équivalent dans l'obtention de colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline.

IV) Role d'un tapis de cellules nourricières

[0065] Chez la souris, la croissance de certaines cellules ES requiert la présence d'un tapis de cellules nourricières. L'effet de ces cellules sur les cellules d'embryons d'oiseau a été testé

[0066] Les cellules sontensemencées dans un milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic-Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et anticorps ARMA (1 µg/ml) comparativement soit sur un fond de gélatine soit sur un tapis de cellules STO traitées à la mitomycine C comme indiqué dans le paragraphe Matériel et Méthodes. Après trois jours de culture, un nouvel ensemencement est ajouté à la culture. Les cytokines CNTF (Ciliary Neuro-Trophic Factor), OSM (Oncostatin M), LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukine 11) et IL-6 (Interleukin 6) sont ajoutées dans le milieu aux concentrations indiquées précédemment.

[0067] La figure 4A représente la croissance de cellules sur gélatine en présence de différentes cytokines. La figure 4B représente la croissance de cellules sur un tapis de cellules nourricières en présence des mêmes cytokines.

Conclusion

[0068] Le nombre de colonies dérivant des cellules de blastoderme et présentant une activité phosphatase alcaline est très nettement accru en présence d'un tapis de cellules nourricières (environ 4-5 fois) avec un maintien entre les deux systèmes des même sensibilités vis à vis des cytokines ajoutées dans le milieu. Les cytokines LIF, IL-11 et IL-6 présentent les meilleurs résultats de stimulation de croissance. Dans des résultats préliminaires, il apparaît de plus que la combinaison de ces 3 cytokines dans le milieu complet ESA avec facteurs produisent des effets cumulatifs très prometteurs quant au maintien et à la prolifération des colonies tant avec des cellules dérivées de disques blastodermiques de caille que de poulet.

V) Caractéristiques immunocytochimiques

[0069] Des études de réactivité par rapport à différents anticorps ont été réalisées. Les anticorps ECMA-7, SSEA-1 et SSEA-3, spécifiques d'un état de totipotence des cellules ES murines sont capables de reconnaître des épitopes dans les populations de cellules aviaires, maintenues dans les cultures. Pour illustrer ces reconnaissances par les anticorps, des doubles marquages activité phosphatase alcaline et anticorps démontrent que toutes les cellules ou les massifs de cellules reconnues par ECMA-7 présentent une activité phosphatase alcaline. Cette propriété a été observée avec tous les anticorps utilisés à des degrés divers.

[0070] Les colonies de cellules phosphatase alcaline positives sont pour environ 20 % d'entre elles marquées par l'anticorps ECMA-7. Cette reconnaissance suggère la présence dans ces massifs et dans ces seules conditions de culture de cellules à caractère "ES". Néanmoins, une hétérogénéité dans les massifs phosphatase alcaline positifs suppose des degrés variables dans l'intensité du caractère "ES".

[0071] Cette hétérogénéité de distribution a été observée sur des cultures primaires. Après repiquages, la proportion de cellules positives, notamment pour ECMA-7, mais également pour SSEA-1 et EMA-1, tend à s'accroître de façon très importante pour obtenir des cultures très homogènes.

[0072] La figure 5 montre respectivement l'activité phosphatase alcaline et la reconnaissance par l'anticorps ECMA-7 de colonies de cellules issues de la culture de blastodermes de caille en présence de différentes cytokines.

[0073] Les anticorps SSEA-1, SSEA-3, également utilisés sur des cellules ES murines reconnaissent également des cellules aviaires dans les massifs phosphatase alcaline positifs.

[0074] Les anticorps NC-1, HNK-1 dirigés respectivement des épitopes de cellules de crêtes neurales et de cellules "human natural killer" reconnaissent en fait les mêmes épitopes et ont été montrés comme reconnaissant certaines cellules immatures du disque blastodermique de poulet. Dans notre système, ces deux anticorps reconnaissent là encore des cellules dans des massifs à activité phosphatase alcaline.

[0075] Les résultats avec NC-1 sont représentés sur la figure 6.

[0076] Les cellules sontensemencées dans un milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic-Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et anticorps ARMA (1 µg/ml) sur un tapis de cellules STO traitées à la mitomycine C comme indiqué dans le paragraphe Matériel et Méthodes. Après deux jours de culture, un nouvel ensemencement est ajouté à la culture. Les cytokines LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukine 11) et IL-6 (Interleukine 6) sont ajoutées dans le milieu aux concentrations indiquées précédemment. La double coloration, activité phosphatase alcaline et détection des épitopes par anticorps est réalisée suivant les

protocoles présentés précédemment.

[0077] Par ailleurs, l'anticorps EMA-1 (Hahnel and Eddy, 1986) initialement dirigé contre des épitopes présents sur les cellules primordiales de la lignée germinale murine a été utilisé contre ces mêmes cellules chez le poulet. En testant cet anticorps dans notre système de culture, nous prouvons démontrer que EMA-1 reconnaît des cellules et colonies de cellules présentant toutes une activité phosphatase alcaline. Il a été par ailleurs vérifié que cet anticorps EMA-1 ne reconnaissait les cellules ES murines que dans leur état de totipotence non différenciée.

[0078] Les anticorps ont été testés soit sur des cultures non différenciées obtenues telles que décrites dans la partie matériel et Méthodes telle que décrite ci-dessus soit sur des cultures qui ont été traitées avec un excès d'acide rétinolique ajouté à la culture (10^{-6} M) pendant au moins 48 heures. Le tableau ci-après indique l'état de reconnaissance par les différents anticorps utilisés.

Anticorps monoclonal	Non différenciées	Différenciées
ECMA-7	+++++	-
SSEA-1	+++++	-
SSEA-3	+++	-
TEC-01	+++++	-
TEC-02	+	+++
TEC-03	++	++
EMA-1	++++	+
EMA-6	+++	++
TROMA-1	-	++++
NC-1	++++	+
HNK-1	++++	+

NC-1 et HNK-1 reconnaissent les mêmes épitopes (Tucker et al, 1984) SSEA-1 et TEC O1 reconnaissent les mêmes épitopes

[0079] Il apparaît que l'expression de ECMA-7 (Kemler et al. (1981)) est la plus importante, suggérant une véritable nature de cellules ES, que TEC-01 (Draber et al. (1987b)) et SSEA-1 (Solter and Knowles (1978)) reconnaissent les mêmes épitopes sur des cellules non différenciées exclusivement. A l'inverse, l'augmentation d'expression de TEC-02 (Draber et al. (1987a)) peut dans ce sens indiquer un état de différenciation induit ou spontané. L'achèvement de cette perte de nature ES est caractérisé par la forte expression de TROMA-1 (Bruler et al. (1980)), présent sur les seules cellules différenciées. L'ensemble de ces anticorps permet donc d'avoir une idée sur l'état de différenciation d'une culture. Des anticorps comme TEC-03 (Draber et al. (1987a)) apparaissent comme relativement indifférents à l'état prononcé de différenciation.

[0080] Il est par ailleurs à souligner que jusqu'à présent ni ECMA-7, ni SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, TEC-02, TEC-03, TROMA-1 n'ont fait l'objet de publication démontrant la réactivité sur des coupes, des cellules ou tout matériel d'origine aviaire.

Conclusion

[0081] Parmi les anticorps testés, certains comme ECMA-7 (Kemler et al. (1981)), SSEA-1 (Solter and Knowles (1978)), SSEA-3 (Shevinsky et al. (1982)) sont caractéristiques des cellules "ES" murines. Ces anticorps reconnaissant des cellules donc potentiellement totipotentes dans les cultures aviaires. Les mêmes observations ayant été obtenues soit avec des cultures de caille soit de poule. D'autres anticorps comme EMA-1 (Hahnel and Eddy (1986)), NC-1 et HNK-1 (Obo and Balch (1981)) sont connus pour reconnaître des épitopes aviaires (et murin pour EMA-1, Urven et al. (1988)) de cellules très indifférenciées et donc aussi susceptible de reconnaître un profil de cellules souches aviaires.

VI) Repiquage des cellules

[0082] Les cellules de disques blastodermiques de caille ou de poulet sont ensemencées sur tapis de cellules nourricières STO. Après différents jours de culture, les cellules sont repiquées sur tapis de cellules STO comme décrit dans la partie Matériel et méthodes. La détection de cellules et massifs positifs à la fois pour l'activité de phosphatase alcaline et pour la colocalisation d'un marquage par ECMA-7 ou NC-1 suggère que les conditions de cultures sont définies pour maintenir dans les cultures secondaires et tertiaires des cellules à caractère totipotent. Le processus de repiquage assure d'ailleurs dès après le premier passage une homogénéité à l'ensemble de la culture, tant morphologiquement, que par la détection des différents épitopes. Les massifs de cellules deviennent très étendus et homogènes, caractère accru par la grande capacité de ces cellules à se diviser rapidement, contrairement aux cellules différenciées présentes initialement dans la culture primaire. Jusqu'à présent ces critères d'identification et de caractérisation peuvent être utilisés et détectés pendant au moins 5 semaines après l'ensemencement.

VII) injection des cellules dans des embryons receveurs

[0083] Les cellules blastodermiques de poulet obtenues en cultures primaires ou après repiquages successifs peuvent être injectées dans des embryons receveurs. Afin de visualiser rapidement une contribution phénotypique des cellules du donneur dans un embryon de poussin receveur, les cellules maintenues en culture proviennent d'une souche pigmentée et les embryons receveurs d'une souche non pigmentée. Les cellules maintenues en cultures sont dissociées et préparées comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes selon le même procédé que pour un repiquage. La suspension cellulaire est alors préparée à raison de $1 \text{ à } 3 \times 10^5$ cellules par ml de milieu ESA. L'oeuf fraîchement pondu, non incubé contenant l'embryon receveur est légèrement irradié entre 5 Gy et 7 Gy. Une petite fenêtre de quelques mm^2 est réalisée dans la coquille du receveur par meulage. La membrane coquillière est découpée au scalpel et les cellules sont injectées à l'aide d'un capillaire étiré dans la cavité subgerminale du disque blastodermique dans un volume de $1 \text{ à } 5 \mu\text{l}$, ce qui correspond de 100 à 1500 cellules au maximum. La moyenne des cellules injectées est de 500 cellules. La fenêtre est alors recouverte de membranes coquillières et scellée. Un morceau de pansement adhésif est appliqué pour parfaire l'étanchéité et limiter au maximum l'évaporation. Après 4 jours d'incubation dans les conditions optimales, les oeufs sont ouverts et les embryons bien développés sont transférés dans une coquille plus grande et remis en incubation pour finir leur développement de façon satisfaisante.

[0084] Un certain nombre d'animaux ont ainsi été obtenus et montrent un taux apparent de chimérisme, phénotypiquement détectable par le marqueur de plumage utilisé et caractéristique de la souche des cellules dérivant de la souche donneur, variant de 5% à 90%. Ce chimérisme peut être obtenu jusqu'à présent indifféremment avec des cellules dérivant de cultures primaires, secondaires, tertiaires. Il est à noter que les pourcentages d'animaux chimères et les taux de chimérisme de ces animaux ne varient pas de façon importante en fonction du temps de culture des cellules injectées. Ceci contribue à souligner la capacité du milieu et au procédé décrit à maintenir des cellules avec un caractère totipotent.

Exemple : animal contrôle non injecté (Fig. 7A)

[0085]

Animal n° 1786-1787 à faible taux de chimérisme (5-10%)
 Animal n° 1782-1783 à taux moyen de chimérisme (50%)
 Animal n° 1740-1741 à fort taux de chimérisme (90%)

Ces animaux sont présentés sur les figures 7B à 7D.

REFERENCES**[0086]**

Brulet et al. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci, 77, 4113.
 Draber et al. (1987a). Cell Differentiation 21, 119.
 Draber et al. (1987b). Cell differentiation 21, 227.
 Eyal Giladi and Kovak (1976), Developmental Biology, 49, 321-337
 Hahnel and Eddy (1986). Gamete Research 15. 25.
 Kemler et al. (1981). J. Embryo. Exp. Morph. 64, 45.
 Obo and Balch (1981). J. Immunology 127, 1024.
 Petine et al (1990) Development 108, 185-189

Solter and Knowles (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5565.
 Shevinsky et al. (1982). Cell 30. 697.
 Tucker et al. (1984). Cell Differentiation 14, 223.
 Urven et al. (1988). Development 103. 299.

5

Revendications

10

1. Procédé de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires (ou cellules ES aviaires), **caractérisé en ce que** :

1) On met en suspension des cellules provenant de disques blastodermiques d'oeufs d'oiseau fécondés dans un milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires, du type comportant un milieu de culture pour cellules aviaires, comprenant :

15

- a) b-FGF, SCF et LIF, ou
 - b) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF, IL-11, IL-6, et IGF-1, ou
 - c) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF et IGF-1,
- (bFGF= basic Fibroblast Growth Factor ; SCF=Stem Cell Factor ; LIF=Leukemia Inhibitory Factor ; IL 11= Interleukine 11; IL6 = Interleukin 6 ; IGF-1 = Insulin-like Growth Factor -1 ; aSCF = avian Stem Cell Factor)

20

- 2) On ensemence un tapis de cellules nourricières avec la suspension obtenue à l'issue de l'étape a),
- 3) On met les cellules à incuber,
- 4) Les cellules en culture sont prélevées et purifiées afin de récupérer des cellules ES aviaires.

25

2. Procédé selon la revendication 1, **caractérisé en ce qu'**entre les étapes 3) et 4), on effectue une ou plusieurs additions échelonnées dans le temps, de milieu neuf identique à celui utilisé dans l'étape 1).

30

3. Procédé selon l'une des revendications 1 à 2, **caractérisé en ce que** le milieu de culture est essentiellement dépourvu d'acide rétinolique actif.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 2, **caractérisé en ce que** le milieu de culture comporte un tapis de cellules nourricières.

35

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, **caractérisé en ce qu'**entre les étapes 3) et 4), on effectue l'addition de milieu neuf au 3^{ème} jour, puis tous les jours.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, **caractérisé en ce que** l'étape 4) est effectuée par traitement enzymatique, lavage dans un milieu ne contenant pas de facteur de croissance et centrifugation.

40

7. Procédé selon l'une des revendication 1 à 6, **caractérisé en ce qu'**à l'issue de l'étape 4), on effectue une étape 5) dans laquelle, les cellules ES sont réensemencées sur un tapis de cellules nourricières, en présence dudit milieu de culture, de manière à obtenir une culture secondaire.

45

8. Procédé selon la revendication 7, **caractérisé en ce que** les étapes 4) et 5) sont répétées plusieurs fois.

9. Culture de cellules ES aviaires *in vitro* susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 8, ladite culture comprenant un milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires comprenant :

50

- a) b-FGF, SCF et LIF, ou
 - b) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF, IL-11, IL-6, et IGF-1, ou
 - c) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF et IGF-1.
- (bFGF= basic Fibroblast Growth Factor ; SCF=Stem Cell Factor ; LIF=Leukemia Inhibitory Factor ; IL 11= Interleukine 11; IL6 = Interleukin 6 ; IGF-1 = Insulin-like Growth Factor -1 ; aSCF = avian Stem Cell Factor)

55

10. Culture de cellules ES aviaires selon la revendication 9, **caractérisée en ce qu'**elle présente 2 à 3 fois plus de colonies positives pour l'activité alcaline phosphatase par rapport au fond constitué en majorité de cellules faiblement positives.

11. Culture de cellules ES aviaires selon la revendication 9 ou 10, **caractérisée en ce que** les cellules réagissent spécifiquement avec au moins un anticorps sélectionné parmi ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 et EMA-6.
12. Culture de cellules ES aviaires selon la revendication 11, **caractérisée en ce que** les cellules ne réagissent pas avec l'anticorps TROMA-1.
13. Culture de cellules ES aviaires selon l'une des revendications 9 à 12, **caractérisée en ce que** les cellules sont modifiées par intégration du gène codant pour une protéine hétérologue.

Claims

1. Avian totipotent embryonic stem cell (or avian ES cell) culture process, **characterised in that**:

1) Cells from fertilised bird egg blastodermic disks are suspended in an avian totipotent embryonic stem cell culture medium, of the type comprising an avian cell culture medium, comprising:

a) b-FGF, SCF and LIF, or

b) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF, IL-11, IL-6, and IGF-1, or

c) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF and IGF-1 (b-FGF = basic Fibroblast Growth Factor; SCF = Stem Cell Factor; LIF = Leukaemia Inhibitory Factor; IL-11 = Interleukin 11; IL-6 = Interleukin 6; IGF-1 = Insulin-like Growth Factor-1; aSCF = avian Stem Cell Factor),

2) A feeder cell layer is inoculated with the suspension obtained following step a),

3) The cells are incubated,

4) The cells in culture are removed and purified so as to retrieve the avian ES cells.

2. Process according to claim 1, **characterised in that**, between steps 3) and 4), one or a plurality of additions of fresh medium identical to that used in step 1) are made at various intervals.

3. Process according to any of claims 1 to 2, **characterised in that** the culture medium is essentially devoid of active retinoic acid.

4. Process according to any of claims 1 to 2, **characterised in that** the culture medium comprises a feeder cell layer.

5. Process according to any of claims 1 to 4, **characterised in that**, between steps 3) and 4), fresh medium is added on the third day, and subsequently every day.

6. Process according to any of claims 1 to 5, **characterised in that** step 4) is performed by means of an enzyme treatment, washing in a medium free from growth factor and centrifugation.

7. Process according to any of claims 1 to 6, **characterised in that**, following step 4), a step 5) is performed wherein the ES cells are reinoculated on a feeder cell layer, in the presence of said culture medium, so as to obtain a secondary culture.

8. Process according to claim 7, **characterised in that** steps 4) and 5) are repeated a plurality of times.

9. In vitro avian ES cell culture liable to be obtained by means of the process according to any of claims 1 to 8, said culture comprising an avian totipotent embryonic stem cell culture medium comprising:

a) b-FGF, SCF and LIF, or

b) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF, IL-11, IL-6, and IGF-1, or

c) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF and IGF-1 (b-FGF = basic Fibroblast Growth Factor; SCF = Stem Cell Factor; LIF = Leukaemia Inhibitory Factor; IL-11 = Interleukin 11; IL-6 = Interleukin 6; IGF-1 = Insulin-like Growth Factor-1; aSCF = avian Stem Cell Factor).

10. Avian ES cell culture according to claim 9, **characterised in that** it exhibits 2 to 3 more alkaline phosphatase activity-positive colonies in relation to the base mainly consisting of low-positive cells.

11. Avian ES cell culture according to claim 9 or 10, **characterised in that** the cells react specifically with at least one antibody selected from ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 and EMA-6.
12. Avian ES cell culture according to claim 11, **characterised in that** the cells do not react with TROMA-1 antibody.
13. Avian ES cell culture according to any of claims 9 to 12, **characterised in that** the cells are modified by incorporating the gene coding for a heterologous protein.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Kultivieren totipotenter embryonaler Zellen von Vögeln (oder embryonaler Stammzellen von Vögeln), **dadurch gekennzeichnet, dass:**

1) Zellen suspendiert werden, die von Blastodermis-Scheiben von Vogeleiern stammen, die in einem Kulturmedium von totipotenten embryonalen Zellen von Vögeln befruchtet wurden, der Art, die ein Kulturmedium für Zellen von Vögeln umfasst, das Folgendes umfasst:

- a) b-FGF, SCF und LIF oder
- b) b-FGF, aSCF (SCF des Vogels), LIF, IL-11, IL-6 und IGF-1 oder
- c) b-FGF, aSCF (SCF des Vogels), LIF und IGF-1, (b-FGF = basischer Fibroblastenwachstumsfaktor; SCF = Stammzellenfaktor; LIF = Leukämie inhibierender Faktor; IL-11 = Interleukin-11; IL-6 = Interleukin-6; IGF-1 = insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1; SCF Stammzellenfaktor des Vogels),

- 2) ein Nährzellenstreifen mit der beim Abschluss von Schritt a) erhaltenen Suspension besät wird,
- 3) die Zellen inkubiert werden,
- 4) die Zellen in Kultur entnommen und nach dem Gewinnen embryonaler Stammzellen von Vögeln aufgereinigt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** zwischen den Schritten 3) und 4) eine oder mehrere über die Zeit gestaffelten Zugaben von neuem Medium, das mit dem in Schritt 1) verwendeten identisch ist, durchgeführt werden.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Kulturmedium im Wesentlichen frei von aktiver Retinsäure ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Kulturmedium einen Nährzellenstreifen umfasst.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** zwischen den Schritten 3) und 4) die Zugabe von neuem Medium am 3. Tag, danach jeden Tag durchgeführt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Schritt 4) durch Enzymbehandlung, Waschen in einem Medium, das keinen Wachstumsfaktor enthält, und Zentrifugation durchgeführt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** beim Abschluss des Schritts 4) ein Schritt 5) durchgeführt wird, in dem die embryonalen Stammzellen erneut auf einem Nährzellenstreifen in Gegenwart des besagten Kulturmediums gesät werden, um eine sekundäre Kultur zu erhalten.

8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Schritte 4) und 5) mehrmals wiederholt werden.

9. In-vitro-Kultur von embryonalen Stammzellen von Vögeln, die durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 erhalten werden kann, wobei die besagte Kultur ein Kulturmedium von totipotenten embryonalen Zellen von Vögeln umfasst, das Folgendes umfasst:

- a) b-FGF, SCF und LIF oder
- b) b-FGF, aSCF (SCF des Vogels), LIF, IL-11, IL-6 und IGF-1 oder
- c) b-FGF, aSCF (SCF des Vogels), LIF und IGF-1

EP 1 149 899 B9

(b-FGF = basischer Fibroblastenwachstumsfaktor; SCF = Stammzellenfaktor; LIF = Leukämie inhibierender Faktor; IL-11 = Interleukin-11; IL-6 = Interleukin-6; IGF-1 = insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1; aSCF = Stammzellenfaktor des vogels).

- 5 **10.** Kultur von embryonalen Stammzellen von Vögeln nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie im Vergleich zu dem Hintergrund, der überwiegend aus schwach positiven Zellen besteht, 2- bis 3-mal mehr Kolonien aufweist, die für alkalische Phosphatase-Aktivität positiv sind.
- 10 **11.** Kultur von embryonalen Stammzellen von Vögeln nach Anspruch 9 oder 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Zellen spezifisch mit mindestens einem Antikörper reagieren, der aus ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 und EMA-6 ausgewählt ist.
- 15 **12.** Kultur von embryonalen Stammzellen von Vögeln nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Zellen nicht mit dem Antikörper TROMA-1 reagieren.
- 20 **13.** Kultur von embryonalen Stammzellen von Vögeln nach einem der Ansprüche 9 bis 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Zellen durch Integration des Gens, das für ein heterologes Protein codiert, modifiziert werden.

20

25

30

35

40

45

50

55

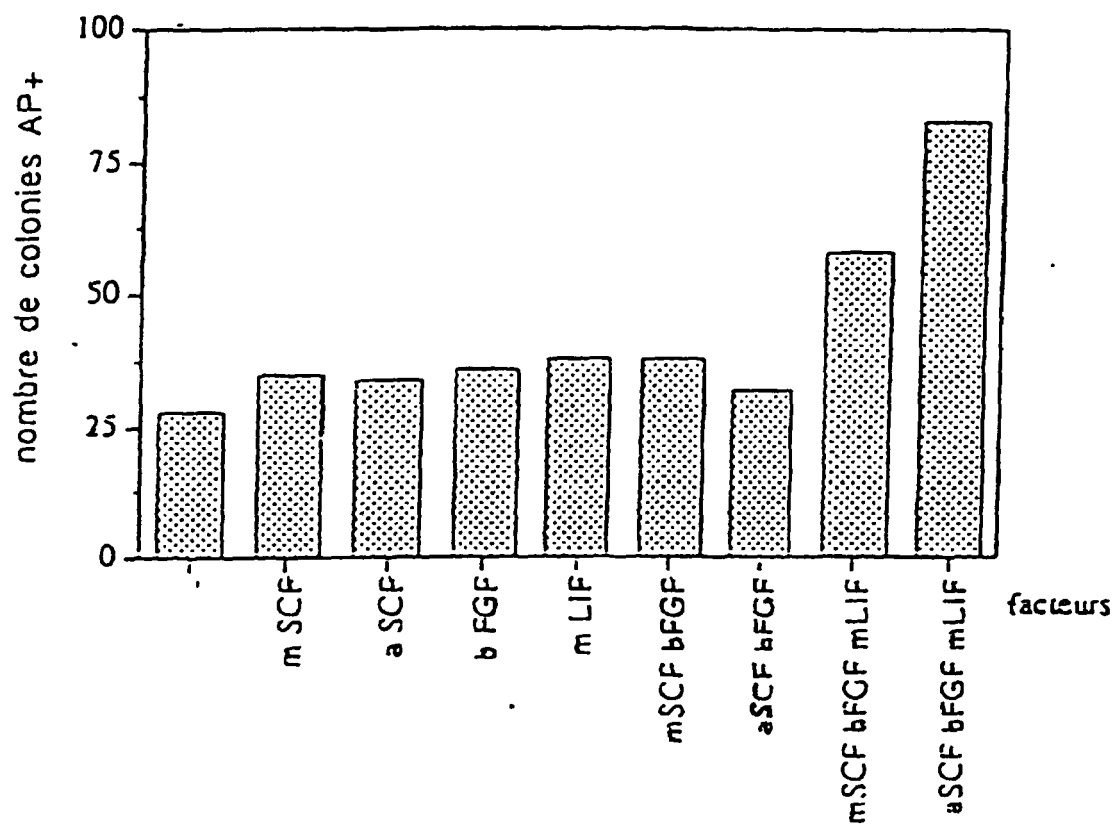


Figure 1

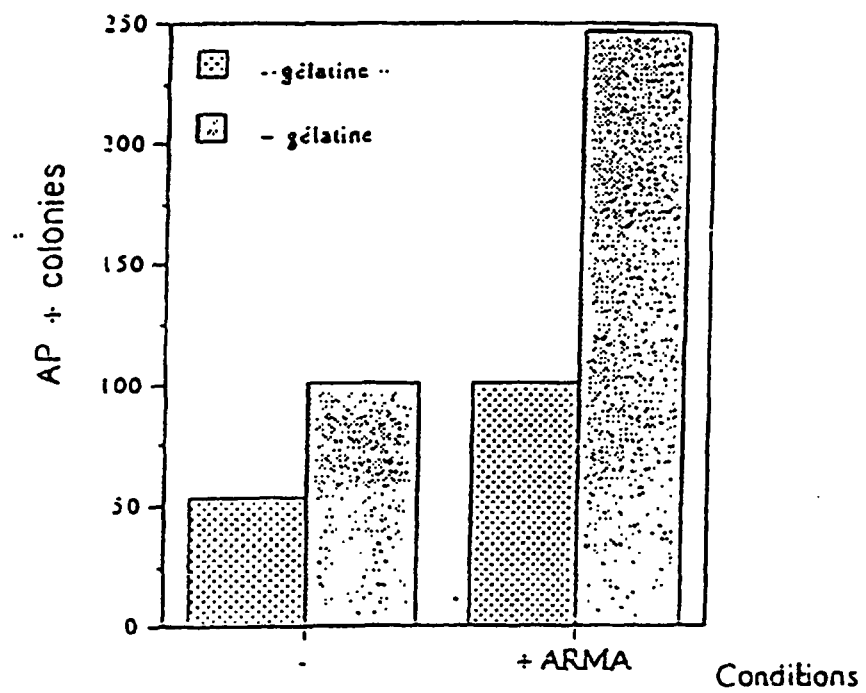


Figure 2

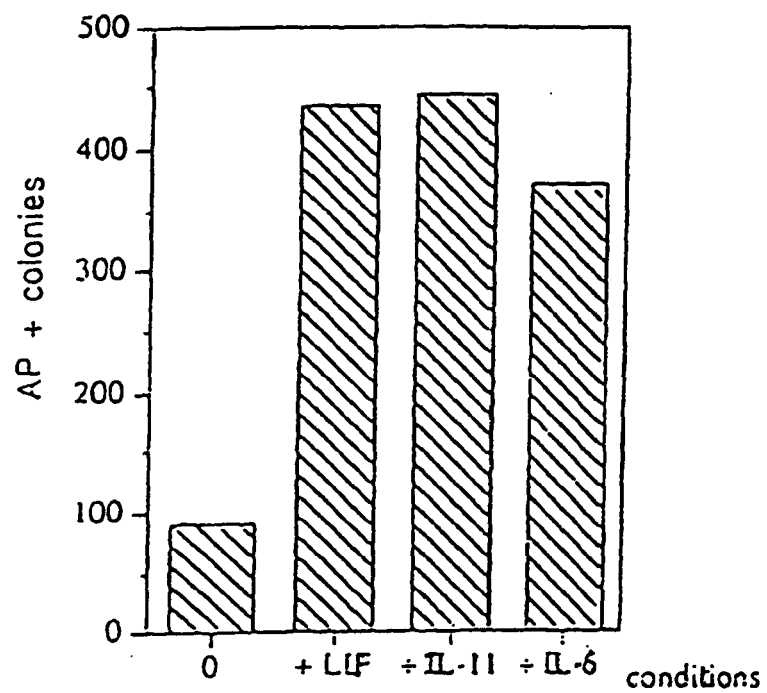
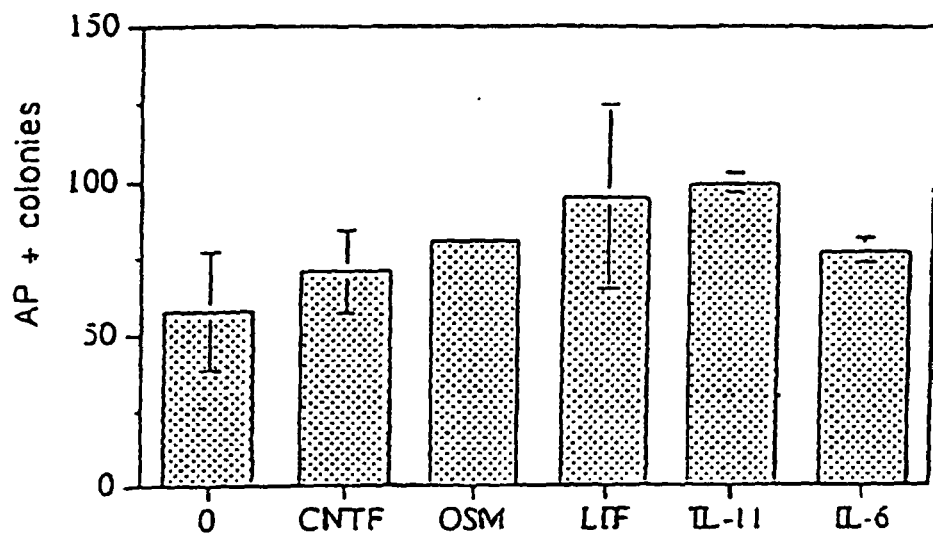
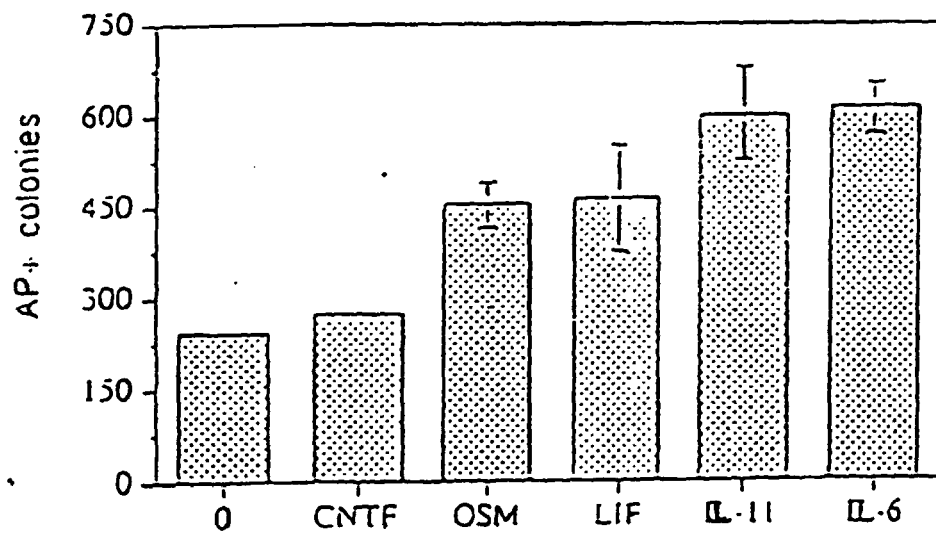


Figure 3



A



B

Figure 4

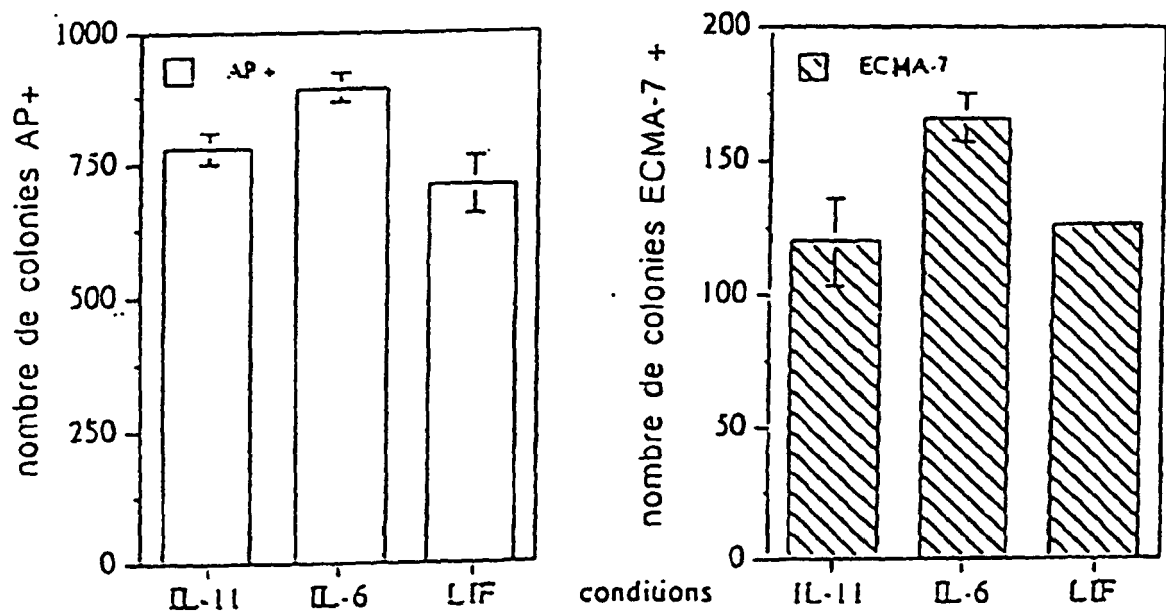


Figure 5

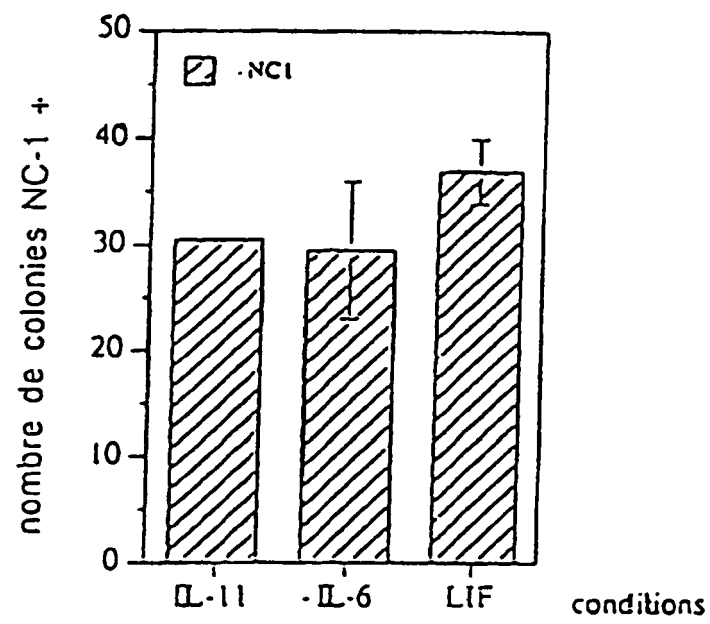


Figure 6

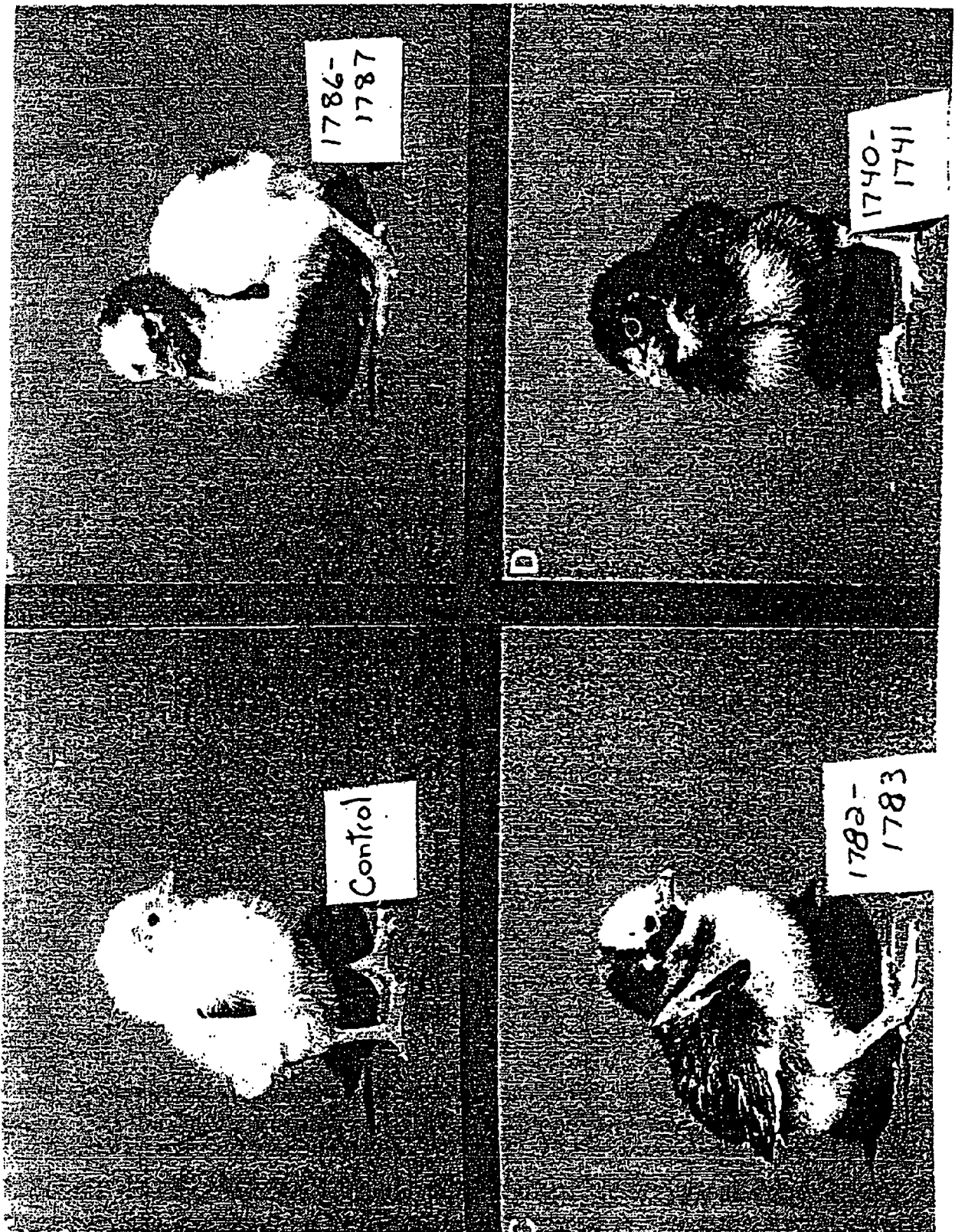


Figure 7

RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA DESCRIPTION

Cette liste de références citées par le demandeur vise uniquement à aider le lecteur et ne fait pas partie du document de brevet européen. Même si le plus grand soin a été accordé à sa conception, des erreurs ou des omissions ne peuvent être exclues et l'OEB décline toute responsabilité à cet égard.

Documents brevets cités dans la description

- WO 9323528 A [0008]

Littérature non-brevet citée dans la description

- **Cosset.** *J. Virol.*, 1990, vol. 64, 10170-1078 [0026]
- **Kawaguchi.** *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, 4460-4464 [0026]
- **Mc Pherson, I. ; Stoker.** *Virology*, 1962, vol. 16, 147 [0031]
- **Brulet et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1980, vol. 77, 4113 [0086]
- **Draber et al.** *Cell Differentiation*, 1987, vol. 21, 119 [0086]
- **Draber et al.** *Cell differentiation*, 1987, vol. 21, 227 [0086]
- **Eyal Giladi ; Kovak.** *Developmental Biology*, 1976, vol. 49, 321-337 [0086]
- **Hahnel ; Eddy.** *Gamete Research*, 1986, vol. 15, 25 [0086]
- **Kemler et al.** *J. Embryo. Exp. Morph.*, 1981, vol. 64, 45 [0086]
- **Obo ; Balch.** *J. Immunology*, 1981, vol. 127, 1024 [0086]
- **Petine et al.** *Development*, 1990, vol. 108, 185-189 [0086]
- **Solter ; Knowles.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1978, vol. 75, 5565 [0086]
- **Shevinsky et al.** *Cell*, 1982, vol. 30, 697 [0086]
- **Tucker et al.** *Cell Differentiation*, 1984, vol. 14, 223 [0086]
- **Urven et al.** *Development*, 1988, vol. 103, 299 [0086]