



HAL
open science

Dérivation de cellules souches pluripotentes à partir de lignées de lapins transgéniques pour le gène hSTAT3-ERT2

Synara Cristina Moreira

► **To cite this version:**

Synara Cristina Moreira. Dérivation de cellules souches pluripotentes à partir de lignées de lapins transgéniques pour le gène hSTAT3-ERT2. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. hal-03455996

HAL Id: hal-03455996

<https://ephe.hal.science/hal-03455996>

Submitted on 29 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique
des Hautes Études



ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté
par

MOREIRA Synara Cristina

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

***DERIVATION DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES A PARTIR DE
LIGNEES DE LAPINS TRANSGENIQUES POUR LE GENE hSTAT3-ERT2***

Soutenu le 20 décembre 2019

devant le jury suivant :

M. ARNAUD Frédéric – Président
Mme AFANASSIEFF Marielle – Tuteur scientifique
M. EXBRAYAT Jean-Marie – Tuteur pédagogique
Mme JOLIVET Geneviève – Rapporteur
Mme MARKOSSIAN Suzy – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Mme AFANASSIEFF Marielle
Institut Cellule souche et Cerveau – Inserm U1208 – INRA USC 1361 - Bron
Directeur : Mme DEHAY Colette

Et de :

M. EXBRAYAT Jean-Marie
Laboratoire de Biologie Générale – UMRS 449
EPHE (Science de la Vie et de la Terre)

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier les co-directeurs Mr Henry Kennedy et Mme Colette Dehay pour avoir accepté de m'accueillir au sein de l'institut Cellule souche et Cerveau.

Un grand merci à Pierre Savatier le Directeur de Recherche de mon équipe d'accueil qui a accepté mon intégration. Merci pour avoir dit oui à Marielle pour la réalisation du projet qu'elle m'a confié. Le fait de travailler dans cette équipe a été très enrichissante. Merci pour ta confiance.

Merci à toi Marielle, qui m'a accueillie avec tant de générosité alors que tu n'avais même pas prévu d'avoir une stagiaire au moment où on s'est rencontré. Tu as fait des efforts pour pouvoir me garder dans l'équipe après mon stage de 3^{ème} année alors que cela s'est avéré compliqué à cause de mes papiers d'immigration. Tu as trouvé un moyen de le faire et tu m'as soutenu pendant tout le long. Grâce à toi, j'ai pu avoir une de mes plus riches expériences de ma vie, aux niveaux professionnel et personnel. Maintenant que j'arrive à la fin de mon parcours, je ne peux pas m'empêcher de penser combien j'ai été chanceuse d'avoir assisté à ton cours juste au moment où j'étais à la recherche d'un stage. Pour moi tu es un exemple de femme forte et déterminée avec un cœur d'or, celle qui accueille tout le monde, qui comprend les difficultés et cherche toujours à offrir un soutien. Merci pour tout ! Tu mérites tout le bonheur qui existe dans cette vie.

Merci à vous Monsieur Exbrayat, mon professeur pendant 3 années à l'ESTBB et puis après mon tuteur pédagogique. Je tiens à vous dire que j'ai beaucoup d'admiration envers vous et votre travail. Cela a toujours été un grand plaisir de discuter de vos projets de recherche, avec des histoires scientifiques passionnantes. Je me sens honorée d'être la dernière élève à avoir été tutorée par vous. Merci beaucoup !

Merci à Monsieur Cortes qui m'a soutenue et m'a aidée pendant des nombreuses années. Sans ton aide tout aurait été beaucoup plus difficile. Ton soutien m'a permis de réaliser un des plus grands rêves de ma vie, celui de finaliser mes études et de m'intégrer dans le monde scientifique. Grâce à toi j'ai découvert la France qui est devenue ma 2^{ème} patrie, mon pays de cœur. J'ai appris tellement de choses à tes côtés. Ma gratitude sera éternelle envers toi. Merci pour tous ces magnifiques années et merci pour m'avoir offert mon petit ange d'amour Mélisse, le plus beau cadeau.

Milles mercis à la plus belle équipe, l'équipe SAV. C'était super sympa de travailler avec vous. Beaucoup de respect et admiration aux chercheurs de l'équipe : Pierre-Yve, toujours avec des précieux conseils en BioMol et des conversations agréables et décontractées ; Nathalie avec son rire qui dégage une bonne énergie, experte des immuno, tes outils pour préparer les lamelles ont révolutionné ma vie (haha !) ; Irène, quoi dire sur toi... le personnage singulier que tu es. Tu fais partie de notre bande de « papoteuses », nos poses déjeunées ensemble me manquent. Impossible de rester triste quand on t'entend rire, par contre tu es très sérieuse quand il s'agit des manip.

Merci à toi Thierry Joly, qui es une personne formidable. La bonne humeur et positivité sont au rendez-vous et les transferts d'embryons avec toi ne sont pas ordinaires, on travaille mais on rigole aussi.

Merci à toi Thierry Blachère, pour tes conseils et ton aide concernant la fonctionnalité du labo, tu as rendu notre vie plus facile depuis que tu as commencé à gérer les commandes.

A mes amis : ma belle Cloé et ma chérie Mouna... Vous savez déjà ce que je pense à propos de vous les filles. Tous les mots ne pourront exprimer ma joie de vous avoir comme amies. Vous êtes mes trésors. Merci pour avoir été et pour continuer à mes côtés. Le trio infernal est soudé pour la vie.

Merci à toi senior Medjani qui dit avec fierté avoir été mon tuteur de stage. Certes tu m'as transmis tes savoir-faire en BioMol et les manipulations des lapins, mais je ne suis pas certaine que mes cellules auraient apprécié d'être entretenues par toi (hahahaha !). Blague à part, merci pour le tutorat, les manip et pour ton soutien moral quotidien lors de l'écriture de mon mémoire. Je t'emmènerai dans d'autres festoches d'enfer.

Merci à toi Antoine, le chouchou de l'équipe. Véritable ami, toujours attentionné et toujours à l'attente d'un gâteau et/ou d'un repas brésilien. Le gâteau c'est fait mais le repas on verra. Si j'ai mis 3 ans pour préparer un gâteau, j'ai encore du temps pour préparer << a comida brasileira >> :=).

Merci à Floflo, j'étais contente quand tu as intégré l'équipe lapin, je ne me sentais plus seule au P2 et c'était sympa nos conversations.

Anaïs tu es une fille incroyable ! J'aime beaucoup discuter avec toi. Super efficace au travail et une bonne conseillère. Merci beaucoup pour ton aide !

Claire, tout comme moi en ce moment tu es à fond dans la rédaction de ta thèse. Eh oui ce n'est pas très facile mais je suis sûre que tu seras au top car t'as réalisé un super travail. Courage et succès !

Willou, mon partenaire super gentil de l'équipe lapin. Content de l'avoir travaillé avec toi et merci pour ton aide en qPCR et merci aussi de bien t'occuper de mes petits lapins.

Etienne, avec toi on ne s'ennuie pas. Le gars charismatique, drôle et intelligent. Je t'ai déjà dit que j'étais agréablement surprise avec toi, la personne que je n'imaginai jamais pouvoir discuter sur certains sujets (tu le sais). D'ailleurs il faudra qu'on en reparle en de ces jours.

Lucie, on s'est côtoyé pendant une courte période mais c'était suffisant pour apprendre à t'apprécier. Content de l'avoir été ta voisine de bureau et c'était tellement sympa nos bavardages. J'espère te revoir plus souvent.

C'était super sympa de partager des moments avec vous. Parler de sciences, des manip réussies et/ou ratées, parler de bêtises et rigoler, cela me manque énormément. Il faudra qu'on essaye de se voir plus ! (Maintenant que je suis plus dispo... Yesss !)

Merci aux membres faisant partie de l'animalerie avec qui j'ai eu l'énorme plaisir de travailler. Brigitte, Manon et toute l'équipe de choque Murielle, Myriam et Xavier, qui font le meilleur pour que nos animaux soient bien. J'avoue que le travail est « hard », mais c'est satisfaisant. Pour moi c'était une expérience incroyable.

Toutes mes pensées et mes remerciements à ma famille et à mes amis qui sont loin mais qui m'accompagnent et vibrent pour ma réussite. Papai, Mamãe, Déo, Flor, Gabe, Amora, Sereia e todos outros. Eu sei que vocês estão felizes por mim. Saibam que se cheguei onde estou é porque venho e tenho uma base sólida. O tempo e a distância são irrelevantes perante o imenso amor que nos une. Eu só tenho que agradecer por ter vocês em minha vida. Tesouros preciosos que levo comigo onde vou. Amo muito muito muito vocês !

Et enfin, merci à moi-même. Je suis fière de mon parcours et de mon travail. Je suis consciente de ma force et de mes capacités. Je sais que ma réalité c'est moi qui la crée et je suis super contente de mon évolution et de toutes mes réalisations.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| ABREVIATION | 09 |
| I. INTRODUCTION | 10 |
| II. RAPPELS THEORIQUES | 11 |
| II.1. Intérêt du modèle lapin | 11 |
| II.2. Les cellules souches embryonnaires (ESC)..... | 11 |
| II.2.1. Définition et origine..... | 11 |
| II.2.2. Principales caractéristiques | 12 |
| II.3. Le noyau de pluripotence | 14 |
| II.4. Les différents états de pluripotence | 16 |
| II.4.1. Etat de pluripotence dit naïf..... | 17 |
| II.4.2. Etat de pluripotence dit amorcé..... | 17 |
| II.4.3. Réversion de l'état amorcé vers l'état naïf..... | 18 |
| II.5. Les ESC de différentes espèces | 19 |
| II.5.1. Les ESC de souris | 19 |
| II.5.2. Les ESC de primates..... | 19 |
| II.5.3. Les ESC de lapin | 20 |
| II.6. Les techniques de transgénése | 20 |
| II.6.1. Applicables chez la souris | 20 |
| II.6.2. Applicables chez le lapin..... | 21 |
| III. PROJET DE STAGE ET STRATEGIE EMPLOYEE | 23 |
| IV. MATERIELS ET METHODES | 25 |
| IV.1. Techniques de culture cellulaire et embryonnaire..... | 25 |
| IV.1.1. Milieux de cultures utilisés..... | 25 |
| IV.1.2. Préparation des cellules nourricières (MEF) | 26 |
| IV.1.3. Dérivation et amplification des fibroblastes issus de peau | 26 |
| IV.1.4. Obtention et mise en culture d'embryons de lapin | 27 |
| IV.1.5. Dérivation de rbESC à partir d'embryons de lapin | 27 |
| IV.1.6. Micro-injection de rbESC dans des embryons hôtes..... | 28 |
| IV.1.7. Test de différenciation cellulaire..... | 29 |
| IV.1.8. Transfection cellulaire | 29 |
| IV.1.9. Préparation de culots secs cellulaires | 29 |
| IV.2. Production et caractérisation des lignées de lapins transgéniques..... | 30 |
| IV.2.1. Vecteurs utilisés | 30 |
| IV.2.2. Obtention des différentes générations | 30 |
| IV.2.3. Génotypage des lapereaux..... | 31 |
| IV.3. Techniques de biologie cellulaire et moléculaire | 32 |
| IV.3.1. Extraction d'ADN | 32 |

| | |
|---|-----------|
| IV.3.2. Extraction d'ARN | 32 |
| IV.3.3. Extraction de protéines | 32 |
| IV.3.4. PCR sur ADN génomique | 33 |
| IV.3.5. qPCR sur ARN cellulaire | 33 |
| IV.3.6. qPCR sur embryon unique..... | 34 |
| IV.3.7. Immuno-marquages | 34 |
| IV.3.8. Western Blot | 35 |
| V. RESULTATS..... | 36 |
| V.1. Les lignées de lapins transgéniques..... | 36 |
| V.1.1. Vérification de l'expression des vecteurs..... | 36 |
| V.1.2. La génération F0 et la transmission du transgène | 37 |
| V.1.3. La génération F1 et l'expression du transgène | 38 |
| V.1.4. Etude et obtention de la génération F2 | 41 |
| V.2. Etude des lignées de rbESC..... | 44 |
| V.2.1. Obtention des lignées | 44 |
| V.2.2. Expression des transgènes | 46 |
| V.2.3. Génotypage et sexage des lignées | 48 |
| V.2.4. Différenciation des lignées..... | 49 |
| V.2.5. Expression des gènes de pluripotence | 52 |
| V.2.6. Test de colonisation | 54 |
| V.3. Effet de facteurs de croissance sur les embryons transgéniques..... | 55 |
| V.3.1. Effet du TGF β et de l'activine | 56 |
| V.3.2. Effet de l'interleukine 6 et du récepteur de l'interleukine 6..... | 58 |
| VI. DISCUSSION..... | 62 |
| VI.1. Choix du transgène..... | 62 |
| VI.2. Méthode de transgénèse..... | 63 |
| VI.3. Expression du transgène..... | 63 |
| VI.4. Stabilité du transgène..... | 64 |
| VI.5. Activation de la protéine transgénique | 64 |
| VI.6. Effet du transgène sur la pluripotence des rbESC | 65 |
| VI.7. Effet du transgène sur la capacité de colonisation des rbESC..... | 66 |
| VI.8. Effet des facteurs de croissance sur les embryons..... | 66 |
| VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... | 68 |
| VIII. REFERENCES..... | 70 |
| IX. ANNEXES..... | 76 |
| RESUME..... | 82 |

TABLE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Chronologie du développement embryonnaire précoce chez le lapin..... | 12 |
| Figure 2 : Voie de signalisation LIF/STAT3 et Inhibition de la voie de signalisation des MAPKs..... | 13 |
| Figure 3 : Propriétés des cellules souches pluripotentes et origine et fabrication des cellules ESC..... | 14 |
| Figure 4 : Les gènes du noyau de pluripotence..... | 14 |
| Figure 5 : Le circuit de régulation de la pluripotence dans les cellules souches pluripotentes murines..... | 15 |
| Figure 6 : Les voies de signalisation maintenant les deux niveaux de pluripotence : naïf et amorcé... | 17 |
| Figure 7 : Transition entre états de pluripotence in vitro chez la souris..... | 18 |
| Figure 8 : Applications des techniques de transgénèse chez le lapin..... | 22 |
| Figure 9 : Schéma illustrant la structure des vecteurs de transgénèse et l'activation de STAT3 par le tamoxifène..... | 24 |
| Figure 10 : Schéma illustrant les différentes étapes de la dérivation des rbESC..... | 28 |
| Figure 11 : Stratégie de création des lignées de lapins transgéniques inducteurs de pluripotence..... | 31 |
| Figure 12 : Western Blot anti-Stat3, anti-V5 at anti-Actine réalisé sur des extraits protéiques de cellules 293FT non transfectées (cellules témoins) ou transfectées avec les vecteurs 373.3 ou 372b et cultivées en absence (-TAX) ou en présence (+TAX) de Tamoxifène..... | 36 |
| Figure 13 : Génotypage des lapereaux F1. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1% des réactions PCR spécifiques du transgène hSTAT3 (amplicons d'environ 1000 pb) et de l'endogène Tbp (amplicons d'environ 550 pb)..... | 38 |
| Figure 14 : Morphologie des rbF issus de biopsie d'oreille de lapereaux F1 transgéniques..... | 39 |
| Figure 15 : Immunocytochimie indirecte sur fibroblastes du lapin transgénique 248 issu de la micro-injection du vecteur 372b (RbF-Stat3-248)..... | 40 |
| Figure 16 : Immunocytochimie indirecte sur des embryons de lapin issus des croisements entre un mâle F1 hétérozygote pour le transgène et une femelle sauvage..... | 41 |
| Figure 17 : Sexage des lignées de lapins F2. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1% des réactions PCR spécifiques du gène SRY localisé sur le chromosome Y. | 42 |
| Figure 18 : Génotypage des lapereaux F2. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1% des réactions PCR spécifiques du transgène hSTAT3-ER ^{T2} (amplicon de 1000 pb) et de l'endogène Tbp (amplicon de 550 pb)..... | 43 |
| Figure 19 : Exemple de la morphologie hétérogène des lignées de rbESC à P5..... | 44 |
| Figure 20 : Morphologie des ICM et excroissances P0 en milieu et matrice spécifiques des mESC..... | 45 |
| Figure 21 : Immunocytochimie indirecte sur les rbESC issues de lapins transgéniques à P5 avec les anticorps anti-Oct4, anti-Stat3 et anti-V5 et en témoin positif des RbF issus du mâle F1 221.... | 47 |

| | |
|---|----|
| Figure 22 : Génotypage des lignées de RbESC de la première expérience avec amplification de l'endogène Tbp et du transgène hSTAT3-ER ^{T2} | 48 |
| Figure 23 : Sexage des lignées de RbESC de la 1ère expérience par amplification PCR du gène SRY.. | 48 |
| Figure 24 : Morphologie à P2 des RbESC de la première expérience lors du test de différenciation.... | 50 |
| Figure 25 : Culture en milieu US sur matrigel ou cellules nourricières (MEF mmc) en comparaison de leur milieu de dérivation respectif..... | 51 |
| Figure 26 : Histogramme représentant les taux d'expression de 11 gènes impliqués dans la pluripotence chez 4 lignées porteuses du transgène hSTAT3-ER ^{T2} (S3+ en bleu) et 4 lignées négatives (S3- en gris)..... | 52 |
| Figure 27 : Histogramme représentant les taux d'expression de 11 gènes impliqués dans la pluripotence chez la lignée transgénique 248-114 (S3+ en couleurs foncées) et la lignée sauvage 248-117 (S3- en couleurs claires), cultivées en milieu US ou USLT sur matrigel (mat) ou cellules nourricières (MEF)..... | 53 |
| Figure 28 : Morphologie des lignées 248-105-GFP et 221-94-GFP en lumière blanche (LB) et épifluorescence verte (GFP)..... | 54 |
| Figure 29 : Immuno-marquage anti-Oct4 et anti-GFP d'embryons de lapin micro-injectés avec des rbESC transgéniques (lignée 221-94-GFP)..... | 54 |
| Figure 30 : Caryotypes anormaux des deux lignées micro-injectés dans des embryons hôtes..... | 55 |
| Figure 31 : Histogramme représentant le taux d'expression moyen du transgène hSTAT3-ER ^{T2} dans les embryons sauvages témoins (WT), transgéniques (S3+) ou non transgéniques (S3-) cultivés dans quatre conditions différentes..... | 56 |
| Figure 32 : Histogramme représentant le taux d'expression des gènes Socs3, Klf4, Klf5 et CYP1b1 dans les embryons transgéniques hSTAT3-ER ^{T2} cultivés dans différentes conditions..... | 57 |
| Figure 33 : Histogramme représentant le taux d'expression moyen des gènes hSTAT3-ER ^{T2} , Stat3, c-Myc, Klf4, Klf5, Gp130, Cyp1b1, LIFR, Oct4, Socs3 et c-Fos d'ICM transgéniques (S3+) ou sauvages (S3-) cultivés dans différentes conditions..... | 59 |
| Figure 34 : Immuno-marquages anti-V5 d'ICM mis en culture pendant 24h dans un milieu US + tamoxifène et observés au microscope cofoncal..... | 60 |
| Figure 35 : Immuno-marquages anti-V5 de rbF et MSC transgéniques (S3+) et sauvages (S3-) cultivés en présence (+TAX) ou en absence (-TAX) de tamoxifèn..... | 61 |

TABLE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau I : Propriétés des cellules souches embryonnaires définissant leur état naïf ou amorcé. tableau adapté de Nichols et Smith 2009 | 16 |
| Tableau II : Composition des différents milieux de culture utilisés sur les cellules | 25 |
| Tableau III : : Résultat des expériences de transgénèse réalisées pour obtenir les lapins inducteurs de pluripotence exprimant le transgène <i>hSTAT3</i> sous deux formes : V5-hSTAT3-ERT2 (vecteur 372b) et V5-ERT2-hSTAT3-ERT2 (vecteur 373.3). | 37 |
| Tableau IV : Tableau récapitulatif des résultats de génotypage des 153 lapereaux F1 | 38 |
| Tableau V : Tableau représentant les résultats d'expression du transgène chez les mâles F1 | 40 |
| Tableau VI : Tableau récapitulatif des croisements réalisés pour produire la génération F2 | 43 |
| Tableau VII : Tableau récapitulatif de la dérivation des lignées de rbESC à partir d'embryons F2 | 44 |
| Tableau VIII : Test de différents milieux pour la dérivation de lignées de rbESC à partir d'embryons F2 | 45 |
| Tableau IX : Effet du LIF et TAX sur la dérivation de lignées de rbESC à partir d'embryons F2..... | 46 |
| Tableau X : récapitulant la caractérisation des lignées de rbESC obtenues en milieu US. | 49 |

ABREVIATIONS

Ac : Anticorps
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
bFGF ou FGF2 : basic Fibroblast Growth Factor
BMP4 : Bone Morphogenetic Protein 4
BSA : Bovine Serum Albumin
CK1 α : Casein Kinase 1 alpha
DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
EB : Embryoid body ou corps embryoïde
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EPHE : Ecole Pratique des Hautes Etudes
EpiSC : Epiblast Stem Cell ou cellule souche de l'épiblaste
ESC : Embryonic Stem Cell ou cellule souche embryonnaire
FBS : Foetal Bovine Serum ou sérum de veau foetal
FSH : Hormone Follico-Stimulante
GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
HepG2 : hépato-carcinome humain
hESC : human Embryonic Stem Cell ou cellule souche embryonnaire humaine
ICM : Inner Central Masse ou masse centrale interne ou bouton embryonnaire
iPSC : cellules souches pluripotentes induites
JAK : Janus Kinase
KI : KnockIn
KLF : Krüppel-Like Factors
KO : KnockOut
KOSR : Knock Out Serum Replacement
LIF : Leukemia Inhibitory Factor
GP130/LIFR : Récepteur hétérodimérique du LIF
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MEF : cellules nourricières ou Mouse Embryonic Fibroblast
mESC : mouse Embryonic Stem Cell ou cellule souche embryonnaire de souris
MMC : Mitomycine C
nhpESC : non humain Embryonic Stem Cell ou cellule souche embryonnaire humaine
Oct 4 : Octamer-binding transcription factor 4
P : passage
Pb : Paire de base
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PFA : ParaFormaldéhyde
PM : Poids Moléculaire
PSC : Pluripotent Stem Cell
PSG : Pénicilline Streptomycine Glutamine
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
qsp : quantité suffisante pour
rbESC : rabbit Embryonic Stem Cell ou cellule souche embryonnaire de lapin
RbF : Rabbit Fibroblasts
RT-qPCR : Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction
SDS : DodécylSulphate de Sodium Stem Cell Factor
STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3
Sox2 : SRY-related HMG-box (High Mobility Group) gene 2
TAX : Tamoxifène
TBP : TATA Box Protein

I. INTRODUCTION

Mon stage s'est déroulé dans un laboratoire de l'Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM). L'INSERM est un établissement public de recherche scientifique et technologique consacré essentiellement à la santé humaine. Créé en 1964, l'INSERM a contribué à l'avancée des connaissances dans le domaine des sciences du vivant et de la recherche médicale. J'ai intégré l'unité 1208, l'Institut Cellule souche et Cerveau qui est composée de sept équipes, dont les travaux sont dédiés d'une part à l'étude de cellules souches et d'autre part aux neurosciences et plus particulièrement au développement et au fonctionnement du cortex cérébral.

Mon équipe d'accueil, appelée "Cellules souches pluripotentes chez les Mammifères" et dirigée par Pierre Savatier, étudie les mécanismes qui régulent les différents états de pluripotence chez plusieurs espèces de mammifères et utilise deux types de cellules souches pluripotentes (PSC) : les cellules souches embryonnaires (ESC) et les cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Elle est divisée en 5 groupes selon l'espèce étudiée et la thématique de recherche du chercheur responsable : Epigénétique (Nathalie Beaujean-Bobineau), Souris (Pierre-Yves Bourillot), Lapin (Marielle Afanassieff), Singe (Irène Askoy), et Homme (Pierre Savatier). J'ai travaillé sur l'espèce lapin avec Marielle Afanassieff dont le projet de recherche vise à obtenir des cellules souches pluripotentes capables de coloniser un embryon receveur, afin de développer les techniques de transgénèse chez cette espèce et de créer des lapins modèles de maladies humaines.

Mon travail s'est inscrit dans le projet Oryctogène dont le but est de favoriser l'état naïf de pluripotence à travers la réactivation de la voie de signalisation STAT3. Pour cela une production de lapins transgéniques pour le gène humain *STAT3-ER^{T2}* (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) a été réalisée. Ce gène code un facteur de transcription essentiel pour le maintien de la pluripotence chez la souris. Mon travail a consisté à étudier l'effet de ce transgène sur la pluripotence des cellules souches embryonnaires de lapin (rbESC). L'ensemble de mon travail a impliqué de la culture cellulaire et embryonnaire, de la biologie cellulaire avec des immunomarquages et des Western Blot, de la biologie moléculaire avec du génotypage par PCR et des analyses d'expression géniques par qPCR et enfin de l'expérimentation animale avec la production d'embryons et la maintenance des lignées transgéniques.

Ce mémoire débutera par une explication du contenu théorique concernant le sujet d'intérêt, ensuite une description des méthodes et des conditions opératoires qui ont permis de mettre en œuvre les expériences, puis une présentation des résultats obtenus et enfin une discussion et une conclusion.

II. RAPPELS THEORIQUES

II.1. Intérêt du modèle lapin

Le lapin est le troisième animal le plus utilisé dans les laboratoires de recherche, après la souris et le rat. En recherche médicale, il peut servir de modèle pour l'étude de nombreuses maladies humaines comme l'athérosclérose, les maladies cardio-vasculaires, les diabètes et les infections microbiennes. En effet, au niveau phylogénétique, le lapin est plus proche des primates que le sont les rongeurs. Ils possèdent des caractéristiques semblables à celles des primates, notamment au niveau de la physiologie cardiaque, du système immunitaire et du métabolisme lipidique, ainsi que des nombreuses similitudes dans les mécanismes du développement embryonnaire (Fisher *et al.*, 2012). En effet, l'embryon de lapin se développe sous forme d'un disque et possède un système de placentation identique à celui des embryons humains. De plus il présente l'avantage de s'implanter tardivement, après le début de la gastrulation, facilitant ainsi l'expérimentation et la mise en place de tests de chimérisme (Duranton *et al.*, 2012).

Les diverses caractéristiques communes retrouvées dans les PSC de lapin et des primates font du lapin une espèce intéressante pour l'étude de la pluripotence. De plus, ces cellules pourraient servir de modèle pour la mise au point des techniques de transgénése chez les gros mammifères, ainsi que pour développer des techniques de conservation des espèces. En effet ces animaux présentent des avantages au niveau économique et pratique avec un élevage facile et peu coûteux. Ils possèdent une période gestationnelle et un temps de génération assez courts, et en raison de leur taille les manipulations peuvent être effectuées plus facilement. Ainsi le lapin peut être un animal modèle très utile pour la recherche fondamentale et médicale, pour les biotechnologies de la reproduction, ainsi que pour l'industrie pharmaceutique avec la création d'animaux bioréacteurs capables de produire des molécules d'intérêt thérapeutiques dans leur lait.

II.2. Les cellules souches embryonnaires (ESC)

II.2.1. Définition et origine

Les cellules souches pluripotentes de l'embryon sont définies par leur capacité à se différencier dans toutes les lignées cellulaires qui composent un organisme adulte, y compris la lignée germinale. Elles se distinguent des cellules totipotentes issues de l'embryon très précoce, qui ont la propriété d'assurer l'ensemble du développement embryonnaire avec la production en plus des annexes embryonnaires. A la fin de la segmentation, les cellules souches pluripotentes correspondent à l'ICM du blastocyste précoce, puis à l'épiblaste du blastocyste tardif (Figure 1). Après ce stade, les cellules entrent en gastrulation pour se différencier en ectoderme, mésoderme et endoderme et ne sont donc plus pluripotentes. Chez le lapin, le stade blastocyste correspond aux stades E3 à E5, soit à des embryons de 3 à 5 jours après la fécondation et la gastrulation débute à E6 juste avant l'implantation qui a lieu vers E7.

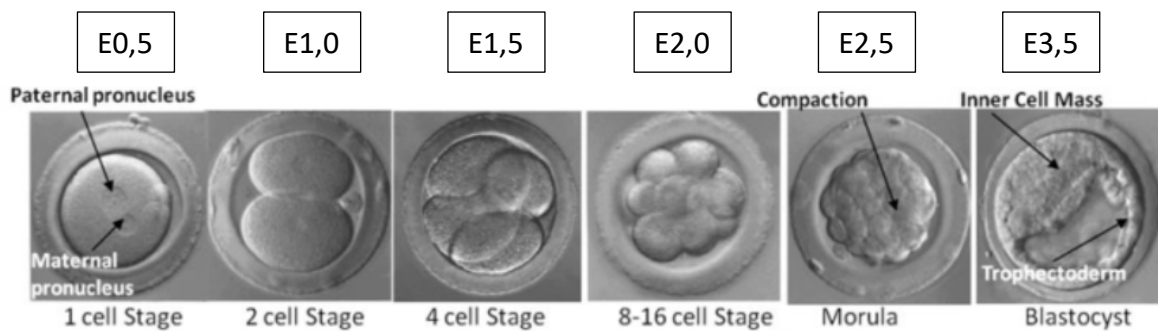


Figure 1 : Chronologie du développement embryonnaire précoce chez le lapin.
Adapté de (Duranthon *et al.*, 2012)

Les premières cellules souches pluripotentes ont été isolées à partir d'ICM de blastocystes de souris et mises en culture par [Evans et Kaufman](#) en 1981. Ces cellules, appelées cellules souches embryonnaires (ESC) peuvent être cultivées et maintenues dans leur stade indifférencié pendant de nombreux passages. Des ESC humaines n'ont été obtenues que bien plus tard en 1998 par [Thomson *et al.*](#) Un autre type de cellules souches pluripotentes a été obtenu par S. Yamanaka tout d'abord chez la souris en 2006 ([Takahashi et Yamanaka., 2006](#)) puis chez l'Homme en 2007 ([Takahashi *et al.*, 2007](#)) : les cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Ces cellules sont issues de la reprogrammation de cellules somatiques différenciées à l'aide de la surexpression de facteurs impliqués dans la pluripotence comme Oct4, Sox2, Klf4 et cMyc. Ces dernières cellules ont révolutionné la conception de la biologie cellulaire et ouvert de nombreux espoirs chez l'homme avec le développement possible de thérapie par remplacements cellulaires.

II.2.2. Principales caractéristiques des mESC

Les trois propriétés majeures des cellules souches embryonnaires sont l'autorenouveaulement, la pluripotence et la tumorigénèse.

L'autorenouveaulement est la capacité des cellules à se multiplier indéfiniment et de façon rapide sans altération du génome. Ce type de division est marqué par une réduction de temps de la phase G1 du cycle cellulaire et une action accrue des télomérases permettant ainsi un maintien des sites télomériques qui empêchent le vieillissement des cellules. Cet autorenouveaulement est dû à deux mécanismes principaux : l'activation de la voie de signalisation LIF/STAT3, et l'inhibition de la différenciation par la répression de la voie de signalisation des MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinase) (figure 2).

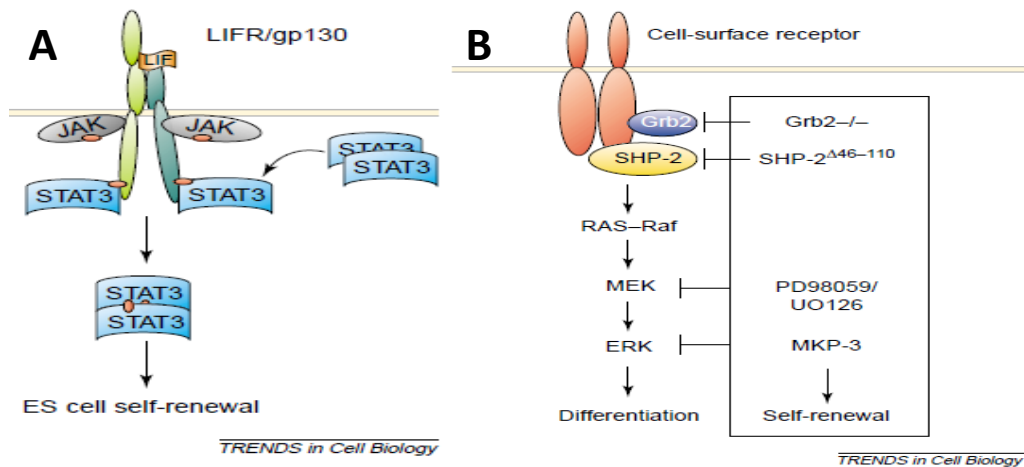


Figure 2 : (A) Voie de signalisation LIF/STAT3 et (B) Inhibition de la voie de signalisation des MAPKs. Schéma tiré de (Burdon et al. 2002)

Les cellules souches pluripotentes sont indifférenciées et peuvent se différencier dans les trois feuillets embryonnaires (l'endoderme, l'ectoderme, et le mésoderme) pour devenir divers types de cellules d'un organisme adulte. Cet état appelé pluripotence est instable chez l'embryon car des gènes spécifiques jouent un rôle fondamental dans la différenciation et le devenir des cellules. Pour stabiliser cet état *in vitro*, l'expression de certains gènes doit être maintenue dans les cellules embryonnaires mises en culture ou réactivée dans les cellules reprogrammées. Ces gènes ont été identifiés chez la souris et forment le noyau de pluripotence. La pluripotence peut être observée *in vitro* en stimulant la différenciation des ESC afin de former des corps embryoides (EB). Les EB sont des structures cellulaires tridimensionnelles qui miment le développement embryonnaire. Après section des EB, on obtient des cellules neuronales, endothéliales, hématopoïétiques et musculaires dérivées des trois feuillets embryonnaires (Keller 1995).

La tumorigénèse est caractérisée par la capacité des cellules souches pluripotentes à créer des tératomes dès qu'elles sont placées en dehors de leur contexte embryonnaire. Ces tumeurs sont non cancéreuses car les cellules n'ont pas de modifications génétiques. Cette propriété peut être vérifiée par l'injection de cellules sous la capsule rénale de souris immunodéprimées, qui entraîne la formation de tératomes présentant des cellules différenciées issues des trois feuillets embryonnaires. (Figure 3).

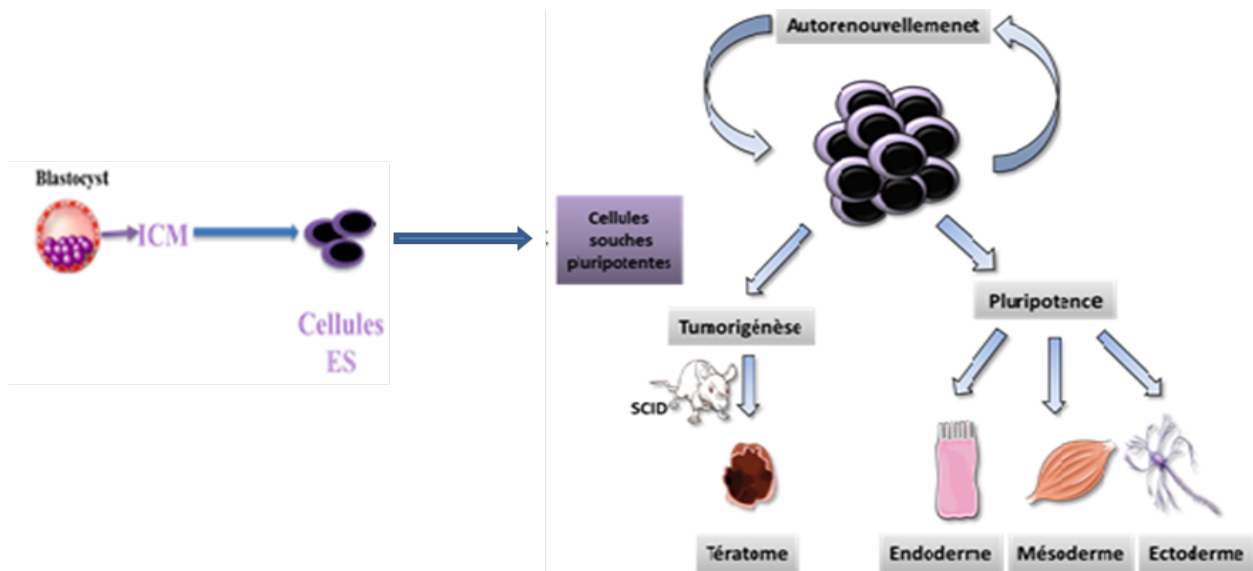


Figure 3 : Propriétés des cellules souches pluripotentes et origine et fabrication des cellules ESC

II.3. Le noyau de pluripotence

Naturellement, les cellules souches pluripotentes ont tendance à se différencier très rapidement sous l'action de différents gènes inducteurs de différenciation comme au cours de l'embryogénèse. Il faut donc trouver *in vitro* un équilibre pour à la fois maintenir la pluripotence et autorenewement. Trois gènes permettent de maintenir cet équilibre et forment le noyau de pluripotence. Ces gènes codent des facteurs de transcription : *Oct4* (Octamer-binding transcription factor 4), *Sox2* (SRV-related HMG-box (High Mobility Group) gene 2) et *Nanog*. Ils s'activent mutuellement formant une boucle de contrôle positif, régulent le réseau de gènes de pluripotence qui assure l'autorenewement et répriment les inducteurs de différenciation (figure 4). Ils ne s'expriment plus après la différenciation des cellules.

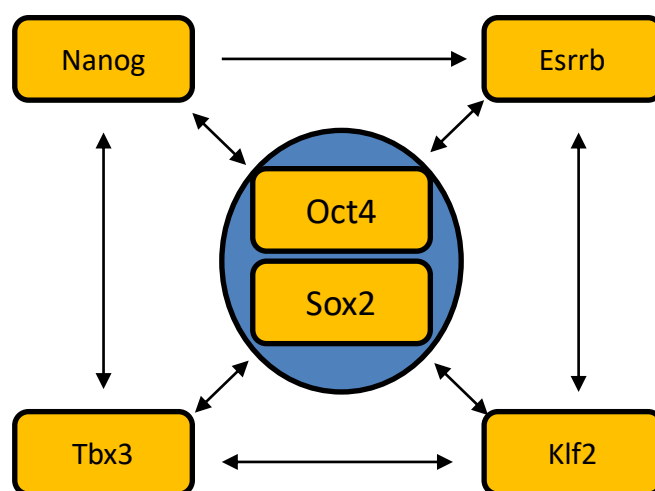


Figure 4 : Les gènes du noyau de pluripotence ; Schéma tiré de (Thèse Osteil. 2013)

L'expression de *Oct4* est nécessaire pour la mise en place de la pluripotence et de la formation de l'ICM dans l'embryon précoce (Nichols *et al.*, 1998). Les travaux réalisés par Niwa *et al.*, en 2000 ont montré qu'un niveau d'expression précis de *Oct4* permet de maintenir l'autorenewement. La réduction de

l'expression réduit la perte de la pluripotence et la différenciation des mESC en trophoctoderme. En revanche, l'augmentation du niveau d'expression de *Oct4* induit une différenciation des cellules en endoderme primitif et en mésoderme.

Le facteur de transcription Sox2 a été identifié comme nécessaire à la mise en place des cellules de l'ICM (Avilion *et al.*, 2003). Les cellules obtenues après la dérivation de l'ICM d'embryon *Sox2*^{-/-} se différencient en cellules du trophoctoderme. Les auteurs soulèvent l'hypothèse que *Sox2* serait impliqué dans l'activation de certains facteurs de transcription qui activent et soutiennent *Oct4*. Dans le cas contraire, une augmentation de *Sox2* diminue l'expression de *Oct4* et *Nanog* entraînant ainsi la différenciation des mESC en neurectoderme (Kopp *et al.*, 2008).

L'expression de *Nanog* permet la spécification des cellules de l'épiblaste dans l'embryon (Chambers *et al.*, 2003 ; Mitsui *et al.*, 2003). Dans les mESC, il y a une forte expression de *Nanog* et son expression diminue lors de la différenciation. Cette surexpression maintient les cellules dans l'état indifférencié. Mais *Nanog* ne soutient pas la pluripotence si *Oct4* ne s'exprime plus. *Nanog* joue un rôle dans l'expression de *Oct4*.

D'autres facteurs interagissent avec les gènes *Oct4*, *Sox2* et *Nanog*. Ces sont des gènes de la famille Krüppel-Like Factors (KLF). Trois principaux facteurs sont impliqués dans le soutien de la pluripotence: Klf2, Klf4 et Klf5. L'inhibition d'un de ces gènes induit la différenciation (figure 5). De plus Klf4 est un facteur important de reprogrammation.

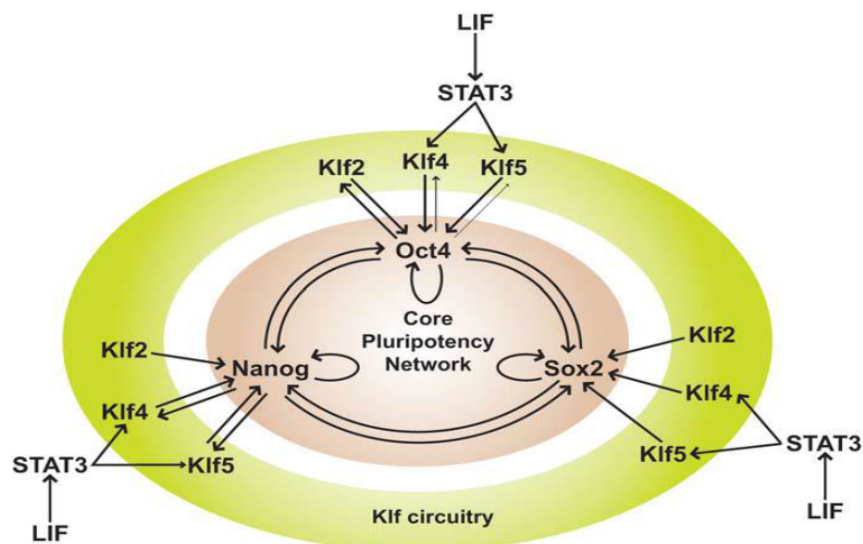


Figure 5 : Figure 5 : Le circuit de régulation de la pluripotence dans les cellules souches pluripotentes murines. Schéma tiré de (Bourillot et Savatier 2010)

II.4. Les différents états de pluripotence

Deux états de pluripotence ont été définis chez la souris suite à la possibilité de dériver des cellules souches pluripotentes à partir de deux stades embryonnaires différents : des mESC à partir de l'ICM de blastocystes pré-implantatoires (Boroviak *et al.*, 2015) et des EpiSC (Epiblast Stem Cells) à partir de l'épiblaste d'embryons post-implantatoires au stade ovocylindre (Brons *et al.*, 2007). Les mESC et les EpiSC diffèrent aussi bien au niveau moléculaire que fonctionnel (tableau I). La principale différence entre ces deux états est leur capacité de colonisation d'un embryon receveur et de participation au développement embryonnaire en donnant tous les tissus hôtes pour former des chimères somatiques et germinales. Seules les mESC sont capables de coloniser un embryon. Considérant les différences entre ces deux types de cellules souches embryonnaires, les deux états de pluripotence ont été établis. Les EpiSC ainsi que les ESC chez les autres espèces caractérisent l'état amorcé et les mESC caractérisent l'état naïf.

Tableau I : Propriétés des cellules souches embryonnaires définissant leur état naïf ou amorcé.
Tableau adapté de Nichols et Smith 2009

| Propriété | Etat Naïf | Etat Amorcé |
|---|--------------------------------------|------------------------------|
| Origine | Blastocyste pré-implantatoire | Epiblaste post-implantatoire |
| Type de cellule souche | mESC | EpiSC ESC autres espèces |
| Chimérisme | OUI | NON |
| Production de Tératome | OUI | OUI |
| Biais de différenciation | NON | VARIABLE |
| Facteurs de pluripotence | <i>Oct4, Nanog, Sox2, Klf2, Klf4</i> | <i>Oct4, Nanog, Sox2</i> |
| Marqueurs Naïfs | <i>Rex1, NrOb1, Fgf4</i> | / |
| Marqueurs de spécification | / | <i>Fgf5, T-Bra</i> |
| Réponse à la voie LIF/STAT3 | Autorenouveaulement | Aucun |
| Réponse à la voie Fgf/Erk | Différenciation | Autorenouveaulement |
| Clonogénicité | Forte | Faible |
| Activation des chromosomes X (a : actif ; i : inactif) | XaXa | XaXi |
| Réponse au 2i/LIF | Autorenouveaulement | Différenciation et Mort |

II.4.1. Etat de pluripotence dit naïf

L'état de pluripotence naïf est l'état dans lequel les cellules s'autorenouvèlent de manière autonome et sont indépendantes de tout facteur de spécification extérieur ou de restriction épigénétique. Ces cellules se trouvent dans un état de pluripotence très stable. En culture, elles forment des petites colonies compactes en forme de dôme et peuvent être dissociées par action de la trypsine (Smith *et al.*, 1988 ; Williams *et al.*, 1998). Ces cellules peuvent être maintenues dans cet état grâce aux facteurs de croissance LIF (Leukemia Inhibitory factor) et BMP4 (Bone marrow Morphogenetic Protein 4) (Figure 6). Le BMP4 agit en inhibant la différenciation des cellules en ectoderme. La pluripotence dépend des événements de signalisation intracellulaire qui suivent la fixation du LIF sur son récepteur hétérodimérique GP130/LIFR, dont la phosphorylation des protéines de la famille Janus tyrosine kinase (JAK), conduisant à la phosphorylation et l'activation de la protéine signal transducteur Stat3 (Humphrey *et al.*, 2004). Le gène *Stat3* est un gène clé du maintien de la pluripotence naïve chez la souris. Le rôle essentiel de Stat3 dans la pluripotence naïve est renforcée par l'observation selon laquelle la voie de signalisation LIF-JAK/STAT3 est un facteur limitant pour la reprogrammation vers la pluripotence naïve, et que la voie JAK/STAT3 peut être suffisante et dominante sur la voie de signalisation FGF/ERK active dans les cellules amorcées, permettant ainsi l'induction d'un état naïf de pluripotence (Chen *et al.*, 2015). Comme dit auparavant, la principale caractéristique des cellules naïves est leur capacité à coloniser un embryon et ainsi former des chimères.

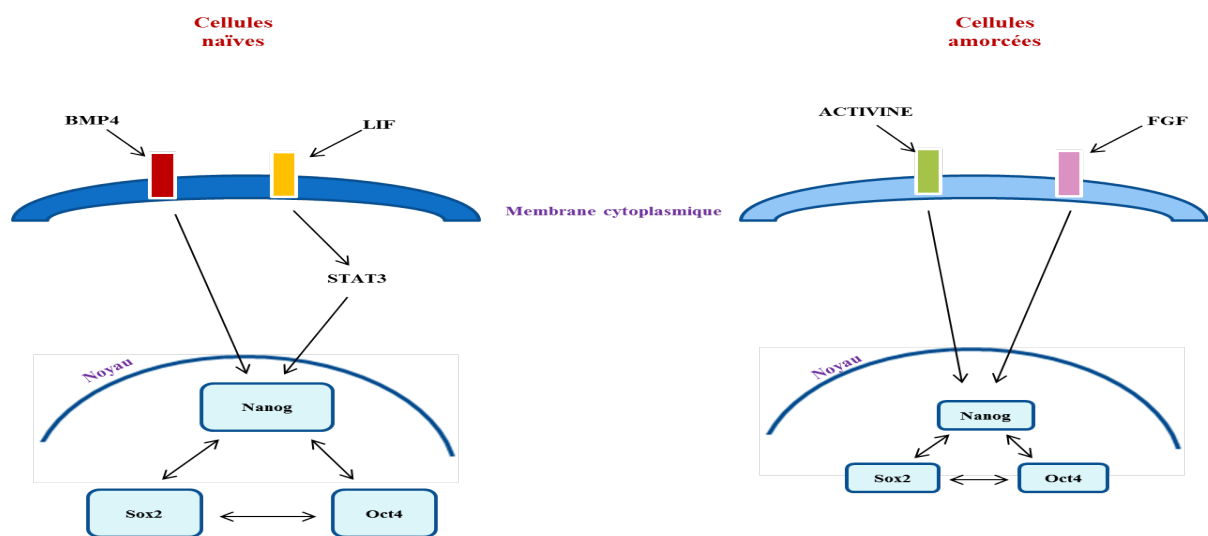


Figure 6 : les voies de signalisation maintenant les deux niveaux de pluripotence : naïf et amorcé

II.4.2. Etat de pluripotence dit amorcé

Les cellules à l'état amorcé de pluripotence se trouvent dans une condition métastable, c'est-à-dire qu'elles peuvent basculer rapidement de l'état fondamental indifférencié à l'état d'engagement vers la différenciation. Elles sont plus difficilement maintenues en culture car elles se différencient spontanément. Elles forment des colonies plates, ne possédant peu ou pas d'activité phosphatase alcaline et sont plus sensibles à la dissociation cellulaire. Elles présentent un faible taux de clonogénicité et des altérations caryotypiques dans leur génome sont plus fréquentes. Ces cellules répondent aux

voies de signalisation bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) et activine (figure 6). Elles possèdent un cycle cellulaire plus long que les ESC naïves et sont incapables de former des embryons chimériques lorsqu'elles sont introduites dans un blastocyste hôte.

II.4.3. Réversion de l'état amorcé vers l'état naïf

L'état de pluripotence des PSC de souris peut être modulé *in vitro* par transition, c'est-à-dire une différenciation des cellules menant à l'état amorcé, ou par réversion qui consiste à reprogrammer les cellules les conduisant à un état plus fondamental de pluripotence (figure 7). Il est possible de réaliser la transition en remplaçant le milieu de culture Sérum/LIF par un milieu conditionné par des cellules d'hépatocarcinome humain (HepG2), ce qui engendra une conversion des cellules en cellules de l'ectoderme primitif dépourvues de capacité à créer des chimères (Rathjen *et al.*, 1999), ou alors en utilisant du KOSR, du FGF2 et de l'activine dans le milieu de culture de mESC pour obtenir des cellules du type EpiSC (cESC) (Guo *et al.*, 2009).

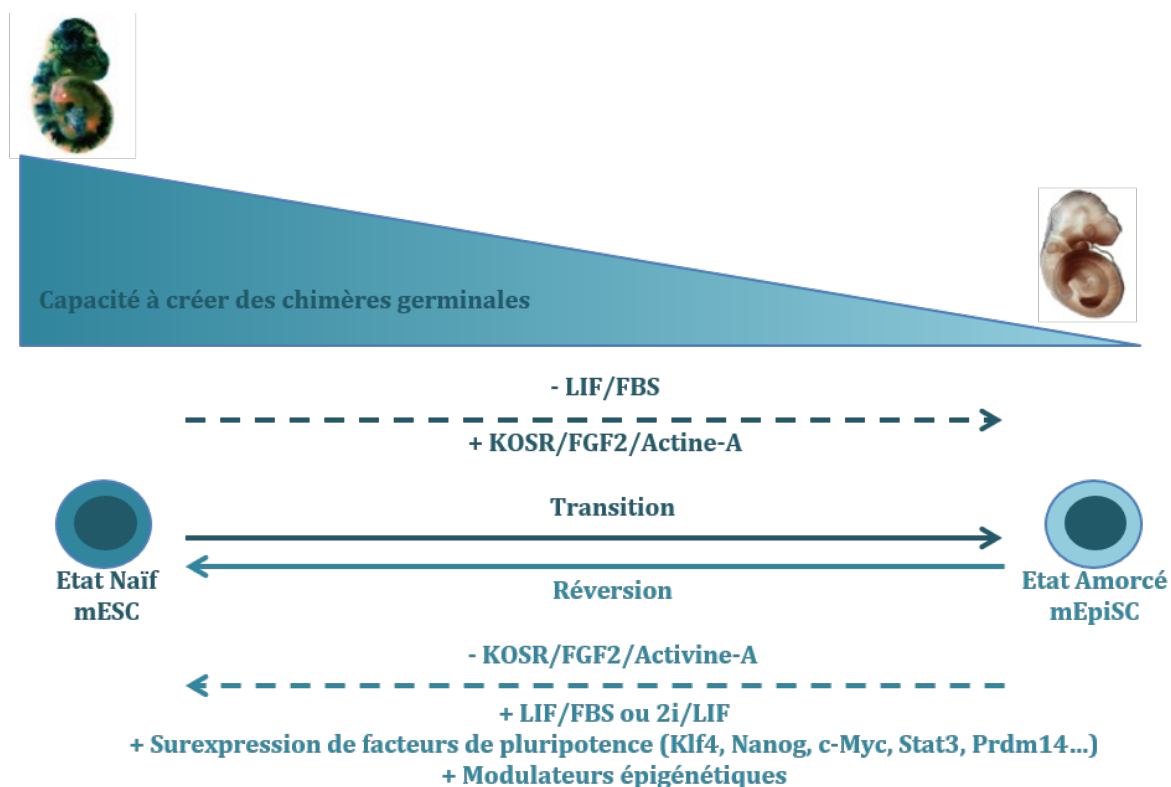


Figure 7 : Transition entre états de pluripotence *in vitro* chez la souris. Schéma tiré de (Afanassieff, 2018).

La réversion des cellules vers l'état naïf de pluripotence s'avère moins efficace que la transition. Le taux de conversion est compris entre 0,1 et 10% et peut être augmenté à 50% en utilisant des modulateurs épigénétiques sur les EpiSC (Hore *et al.*, 2016). Pour réaliser la réversion on peut stimuler la surexpression des gènes de pluripotence tels que *Nanog*, *Oct4*, *Klf4*, *Klf2*, *Stat3*, *c-Myc*, *Tfcp2ll*, *Nr5a2* et *Prdm14* (Silva *et al.*, 2009 ; Guo *et al.*, 2010 ; Hall *et al.*, 2009 ; Hanna *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2010 ; Yeo *et al.*, 2014 ; Qiu *et al.*, 2015 ; Okashita *et al.*, 2016). Il est possible aussi d'induire la réversion en renforçant l'activité de la voie WNT en utilisant des inhibiteurs de GSK3 β , et de la *Casein Kinase 1 alpha* (CK1 α) (Tsukiyama *et al.*, 2014 ; Illich *et al.*, 2016). Le caractère métastable des cellules

joue un rôle important sur la modulation de la pluripotence. L'hétérogénéité des cellules au niveau de l'expression de gènes de pluripotence a un impact sur la différenciation ou sur la reprogrammation.

II.5. Les ESC de différentes espèces

II.5.1. Les ESC de souris

Les mESC ont été les premières cellules souches embryonnaires isolées (Evans et Kaufman, 1981). Chez la souris, deux états de pluripotence ont été définis suite à la possibilité de dériver des cellules souches pluripotentes à partir de deux stades embryonnaires différents : des mESC à partir de l'ICM de blastocystes pré-implantatoires et des EpiSC à partir de l'épiblaste d'embryons post-implantatoires au stade ovocylindre (Brons *et al.*, 2007). Les mESC et les EpiSC diffèrent aussi bien au niveau moléculaire que fonctionnel. Les EpiSC caractérisent l'état amorcé et les mESC l'état naïf. La dépendance des mESC à l'activité de la voie LIF/GP130/STAT3 est la première caractéristique des cellules à l'état naïf de pluripotence. La souris et le rat sont les seules espèces connues à ce jour pour lesquelles des cellules naïves capables de coloniser un embryon hôte, ont été obtenues.

II.5.2. Les ESC de primates

Les premiers travaux de recherche sur les cellules souches embryonnaires chez les primates ont été publiés dans les années 90 par l'équipe du professeur James A. Thomson de l'Université du Wisconsin aux États-Unis. Des lignées d'ESC ont été isolées à partir des primates non humains (nhpESC), notamment chez le macaque rhésus (Thomson *et al.*, 1995) et le marmoset (Thomson *et al.*, 1996), puis les premières cellules souches embryonnaires humaines (hESC) ont été obtenues (Thomson *et al.*, 1998). La croissance des PSC de primate se fait en présence de FGF2 et d'actine (Vallier *et al.*, 2005). Les hESC et nhpESC présentent les mêmes caractéristiques au niveau moléculaire et fonctionnel que les EpiSC. Elles expriment les mêmes marqueurs de surface, se multiplient en formant des colonies plates et supportent mal la dissociation par la trypsine. De ce fait, l'état de pluripotence de ces cellules se trouve être l'état amorcé. Bien que les acteurs de la voie LIF/GP130/STAT3 soient exprimés et potentiellement activables dans les hESC, cette voie n'a pas une action de soutien de la pluripotence. (Daheron *et al.*, 2004 ; Humphrey *et al.*, 2004).

II.5.3. Les ESC de lapin

Les premières cellules souches embryonnaires de lapin (rbESC) ont été mises en culture par [Giles *et al.*, en 1993](#). Ils ont cultivé des ICM de lapin pendant trois jours avant de les réinjecter dans des embryons receveur et ont démontré que les cellules embryonnaires conservaient leur capacité à coloniser un embryon et à former des chimères. Puis, les premières lignées stables de rbESC ont été obtenues par des équipes chinoise et japonaise en 2006 et 2008 ([Honda *et al.*, 2008](#)). Les rbESC sont cultivées sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) qui servent de cellules nourricières fournissant notamment de l'activine indispensable au maintien de leur pluripotence. Le milieu de culture contient du Knock Out Serum Replacement (KOSR) et le facteur de croissance bFGF2. Le FGF2 semble indispensable pour activer les voies PI3K/AKT et MAPK ([Wang *et al.*, 2008](#)). L'autorenouveau des rbESC dépend donc des voies Activine/TGFβ/SMAD1-2 et FGF2 ([Honda *et al.*, 2013](#)). Le LIF peut être aussi utilisé dans le milieu de culture et son action favorable à la dérivation des rbESC a été observée ([Intawicha *et al.*, 2009](#)). Les rbESC forment des colonies plates, étendues et monocouche. Elles ont une forte activité phosphatase alcaline et expriment les gènes de pluripotence *Oct4*, *Sox2* et *Nanog* ([Wang *et al.*, 2007](#) ; [Honda *et al.*, 2008](#)). Elles ne tolèrent pas d'être à l'état unicellulaire et doivent donc être amplifiées en « clumps » en utilisant de l'acutase. Ces cellules possèdent des caractéristiques similaires à celles des PSC de primates et sont incapables de coloniser un embryon receveur. Elles se renouvèlent donc dans l'état amorcé de pluripotence ([Osteil *et al.*, 2013](#)).

II.6. Les techniques de transgénèse

II.6.1. Applicables chez la souris

Il existe différentes méthodes pour produire un animal transgénique. Les premières souris transgéniques ont été obtenues par infection rétrovirale d'embryon en 1976 et par micro-injection d'ADN nu dans le pronucléus mâle des zygotes ([Gordon et Ruddle 1983](#)). Ces deux techniques sont considérées comme produisant une transgénèse dite "au hasard" car l'intégration du transgène se fait de façon aléatoire dans le génome de l'hôte, en de multiples copies et dans des sites inconnus. Pour réaliser des modifications génétiques ciblées, il existe deux autres techniques : le transfert nucléaire et la micro-injection des ESCs. Ces techniques utilisent des cellules pluripotentes ou somatiques modifiées en culture dont le transgène d'intérêt est inséré dans un locus précis du génome des cellules grâce à des techniques de recombinaison homologue ou en utilisant des endonucléases du type Zing Finger, CRISPR/cas9 ou TALEN. En 1997 les scientifiques ont présenté le premier animal cloné, la célèbre brebis Dolly ([Wilmut *et al.*, 1997](#)), suivi un an plus tard par le clonage d'une souris ([Wakayama *et al.*, 1998](#)). Le clonage reste tout de même une technique peu efficace et plus difficile à mettre en œuvre que la micro-injection des ESC dans un embryon hôte. La première souris transgénique knockout (KO) a été produite par mutation ciblée du gène *HPRT* dans les ESC ([Thompson *et al.*, 1989](#)). Considérant l'aspect naïf de pluripotence de mESC, la transgénèse dirigée par micro-injection des cellules souches embryonnaires chez cette espèce est donc plus facilement réalisables et on peut obtenir un taux de 20-30% de sourceaux chimériques présentant un taux de chimérisme pouvant atteindre presque 100%.

Le développement récent des nouvelles techniques utilisant les endonucléases, et surtout la facilité d'utilisation et le coût très faibles des systèmes Crispr/Cas9, permettent d'obtenir des souris KO dès la première génération. Mais ces systèmes n'ont pas encore fait leurs preuves pour des modifications génétiques plus complexes comme les insertions ciblées.

II.6.2. Applicables chez le lapin

Les premiers lapins transgéniques ont été produits par micro-injection directe d'ADN dans le zygote (Hammer *et al.*, 1985). En 2002 des lapins clonés ont été produits par transfert nucléaire à partir de cellules somatiques adultes (Chesné *et al.*, 2002). Néanmoins le transfert nucléaire chez le lapin reste une technique très difficile et très peu efficace. En raison du manque de lignées de rbESC capables de produire des organismes chimériques, les techniques de transgénèse ciblée chez le lapin sont difficilement applicables (figure 8). Seule quatre expériences de micro-injection de cellules embryonnaires ont permis d'obtenir des lapins chimériques : (i) l'injection d'un ICM dans un blastocyste précoce (Giles *et al.*, 1993); (ii) l'agrégation des deux embryons dans une même morula ou l'injection de un à trois blastomères dans un embryon de 8/16 cellules (Yang *et al.*, 1988); (iii) l'injection des cellules gonadiques issues d'un fœtus mâle dans un embryon de 8/16 cellules (Moens *et al.*, 1996); et (iv) l'injection de 100 cellules issues d'une culture d'ICM en présence de FBS dans un blastocyste (Schoonjans *et al.*, 1996). Malheureusement les taux de colonisation des ICM et de chimérisme des fœtus obtenus avec des rbPSC sont très bas (10% et 3% respectivement) par rapport à ceux obtenus chez la souris (Tapponnier *et al.*, 2017). L'utilisation des endonucléases s'est également beaucoup développée chez le lapin pour créer des modèles de délétions géniques (KO) (Bosze *et al.*, 2016 ; Honda et Ogura 2017). Mais la seule possibilité actuellement pour créer des lapins knockin (KI), est l'insertion d'un transgène dans le locus nommé ROSA26, qui est ubiquitairement exprimé et qui a été mis en évidence récemment chez cette espèce (Yang *et al.*, 2016). Par conséquent, le développement et l'application de lapins modèles génétiquement modifiés sont très limités. Aboutir à l'obtention des rbESC à l'état naïf serait très intéressant pour le développement des techniques de transgénèse ciblée et permettrait à la communauté scientifique d'avoir à disposition des modèles de maladies humaines autres que ceux développés chez les rongeurs. En effet les ESC naïves peuvent être modifiées génétiquement *in vitro*, vérifiées pour l'expression adéquate du transgène et ensuite seulement micro-injectées dans un embryon hôte pour produire des chimères somatiques et germinales, capables de transmettre la modification génétique à ses descendants et donc de produire une lignée d'animaux transgéniques (figure 8).

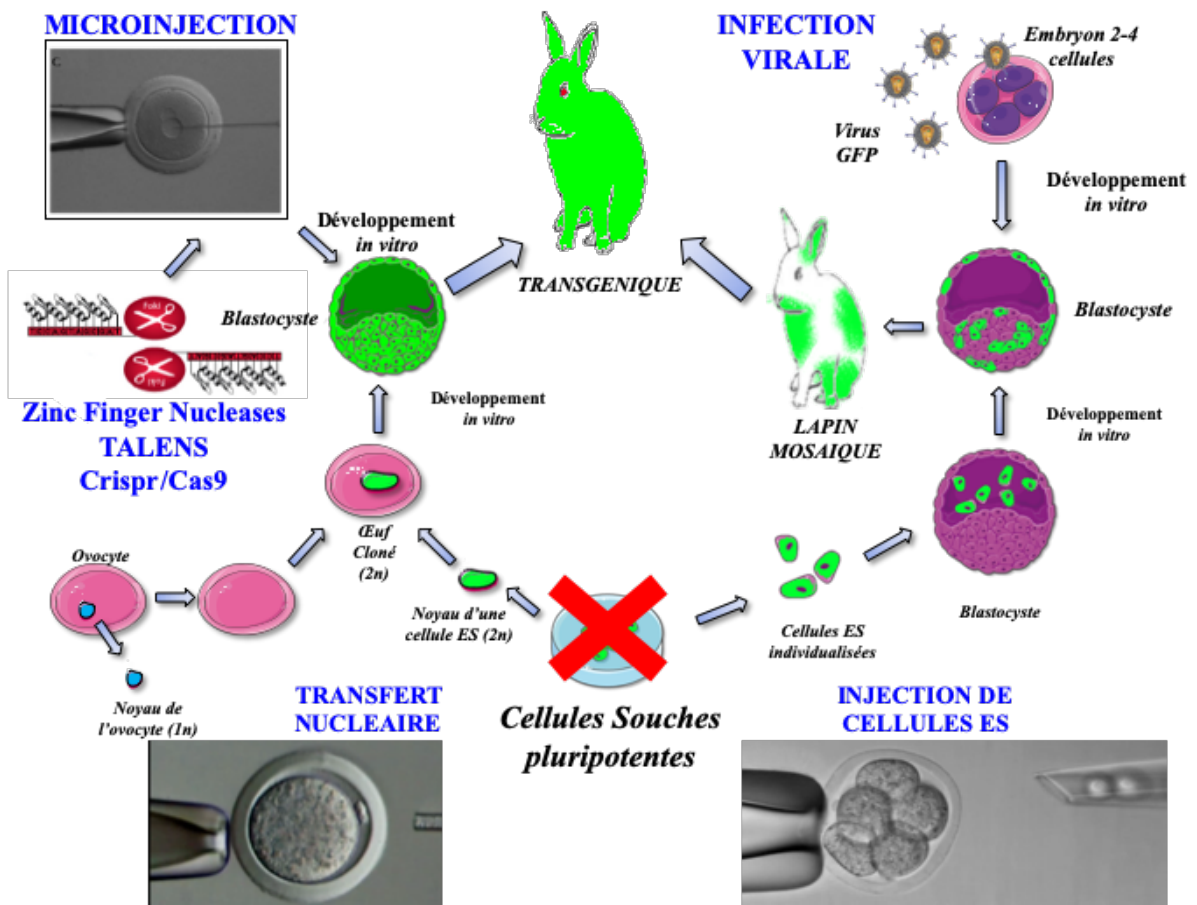


Figure 8 : Applications des techniques de transgénèse chez le lapin

III. PROJET DE STAGE ET STRATEGIE EMPLOYEE

Mon projet est intégré dans le programme de recherche de mon tuteur scientifique, Marielle Afanassieff, qui vise à caractériser la pluripotence chez l'embryon de lapin et à obtenir des cellules souches pluripotentes de lapin capables de coloniser un embryon receveur et ainsi de produire des lapins chimères. Dans ce cadre, j'ai participé au projet Oryctogène dont le but est de favoriser l'état naif de pluripotence à travers la réactivation de la voie de signalisation STAT3. En effet, comme nous l'avons vu précédemment le facteur Stat3 a un rôle clé dans le maintien de la pluripotence naïve chez la souris. De plus, la surexpression d'une forme hormone-dépendante *mStat3-ER^{T2}* a permis de reprogrammer des ESC et iPSC humaines à l'état naif de pluripotence (Chen *et al.*, 2015). Ce travail réalisé par mon équipe d'accueil laisse à penser que la voie LIF/Gp130/JAK/STAT3 peut être activée chez des espèces dont les cellules pluripotentes se stabilisent spontanément en culture à l'état amorcé. Afin de vérifier cette hypothèse chez une autre espèce, mon équipe a créé des lignées de lapins transgéniques inducteurs de pluripotence, c'est à dire porteurs d'une forme activable du gène humain *STAT3*. L'idée était d'induire l'activation de la protéine transgénique hSTAT3 lors de la dérivation de rbESC, afin de faciliter la mise en place des voies de signalisation présentes dans les PSC naïves. Mon projet a donc consisté en la dérivation de cellules souches embryonnaires à partir de lignées de lapins transgéniques pour le gène *hSTAT3-ER^{T2}*. La figure 9 illustre les vecteurs de transgénèse utilisés et le mécanisme d'activation de la protéine transgénique hSTAT3-ER^{T2}.

Des lapins transgéniques sur-exprimant le gène *hSTAT3-ER^{T2}* ont été produits par la technique de micro-injection d'ADN nu dans le pronucléus mâle d'ovocytes fécondés. Les vecteurs de transgénèse véhiculent ce gène humain sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur fort et ubiquitaire, le promoteur CAG. Le transgène est associé à un tag V5 et à une ou deux séquences ER^{T2}. La séquence ER^{T2} est la séquence de liaison du récepteur aux œstrogènes qui a été mutée pour ne fixer que le tamoxifène (un analogue synthétique). Cette séquence permet de rendre la protéine hSTAT3 activable. En effet normalement, la protéine STAT3 est activée par la voie LIF, puis phosphorylée, dimérisée et transloquée dans le noyau où elle a son effet de modulateur de la transcription (Metzger *et al.*, 1995). Dans le cas du transgène *hSTAT3-ER^{T2}*, la protéine est piégée dans le cytoplasme par les protéines du stress. Elle n'est activée qu'en présence du tamoxifène qui permet sa séparation des protéines du stress et donc sa phosphorylation, sa dimérisation et sa translocation vers le noyau (Figure 9). Ainsi, dans les lapins transgéniques hSTAT3-ER^{T2}, le transgène est exprimé de façon ubiquitaire, mais la protéine est inactive tant que l'on ne rajoute pas du tamoxifène, ceci afin d'éviter des effets néfastes de la surexpression de STAT3 au cours du développement embryonnaire ou dans des processus physiologiques chez les lapins adultes. Deux vecteurs ont été utilisés, les vecteurs 372b et 373.3, qui diffèrent seulement par le nombre de séquence ER^{T2} : une dans le premier et deux dans le second. Ces deux vecteurs possèdent des séquences isolatrices pour éviter leur inactivation lors d'insertion dans des zones chromosomiques inactives. Ils possèdent aussi des séquences LoxP encadrant le transgène, afin de pouvoir éliminer ce dernier si besoin par l'action d'une recombinase Cre.

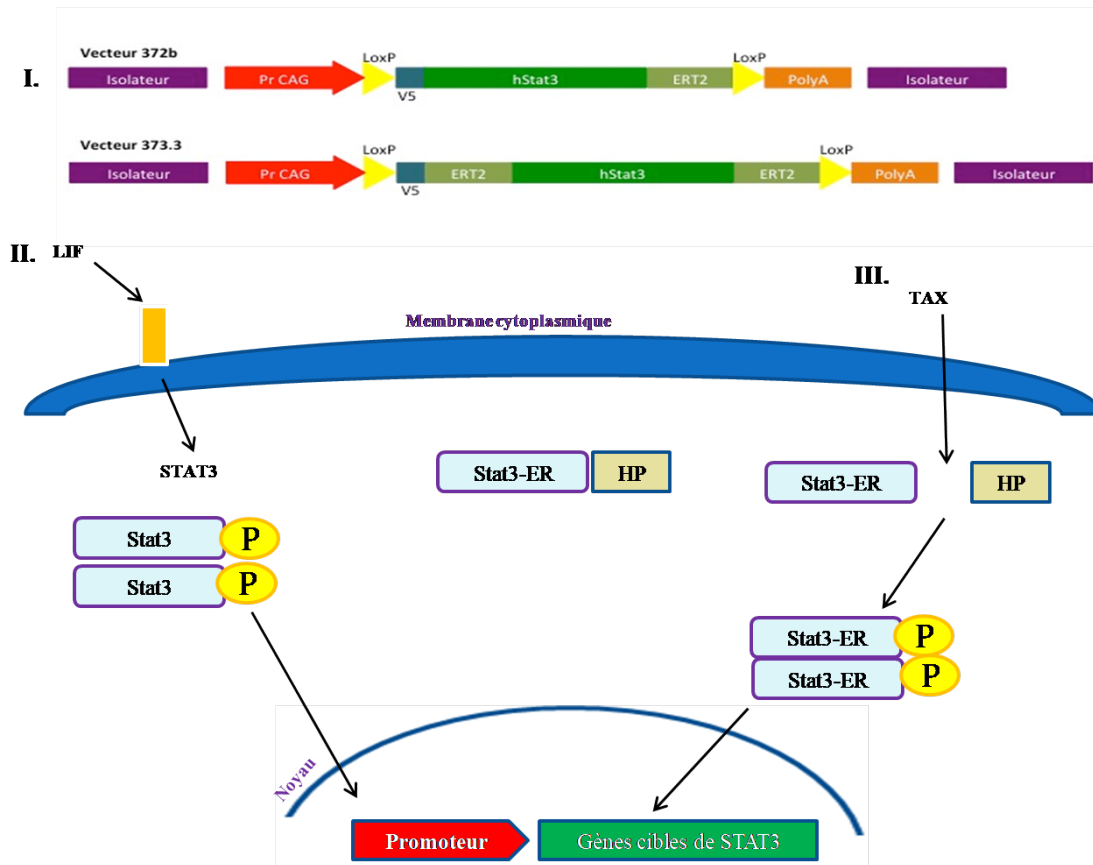


Figure 9 : Schéma illustrant la structure des vecteurs de transgène et l'activation de STAT3 par le tamoxifène. I : Structure des vecteurs 372b possédant un site ERT2 et 373.3 possédant deux sites ERT2. II : activation de la protéine endogène STAT3 par la voie LIF. III : action du tamoxifène sur la protéine transgénique STAT3-ER.

Mon travail de stage a donc consisté tout d'abord à valider le modèle transgénique en vérifiant l'expression activable de la protéine hSTAT3-ERT², puis à dériver et à caractériser des rbESC à partir d'embryons issus de ces animaux transgéniques.

IV. MATERIELS ET METHODES

IV.1. Techniques de culture cellulaire et embryonnaire

IV.1.1. Milieux de cultures utilisés

Quatre grands types de cellule ont été cultivés : des fibroblastes embryonnaires de souris servant de cellules nourricières (MEF), des cellules tumorales humaines utilisées pour les transfections (293FT), des fibroblastes de lapin (cultures primaires issues de biopsie de peau de lapin) (rbF) et des cellules souches dérivées à partir de l'ICM d'embryon de lapins transgéniques (rbESC). En plus, des cultures d'embryons issus de croisements de lapins transgéniques avec des lapins sauvages ont été réalisées. Les différents milieux utilisés sont présentés dans le tableau II. Les MEF, les cellules 293FT et les rbF sont cultivés à 37°C et 5% de CO₂, les rbESC sont cultivées à 38°C, 5% de CO₂ et 5% O₂, et les embryons de lapin sont cultivés à 38°C et 5% de CO₂.

Tableau II : Composition des différents milieux de culture utilisés sur les cellules

| | MEF | 293FT | rbF | Embryon (milieu RDH) | RbESC (milieu US) |
|--|------------|--------------|------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12(Gibco) | | | | | 500 ml |
| Milieu DMEM + pyruvate (Gibco) | 500 ml | 500 ml | 500 ml | | |
| DMEM + glutamax (Gibco), RPMI + Glutamax (Gibco), F10 + Glutamax (Gibco) | | | | 16 ml 16 ml 16 ml | |
| KOSR (Invitrogene) | | | | | 65 ml |
| FBS (Invitrogene) | 50 ml | 50 ml | 50 ml | | 65 ml |
| Bovin serum albumine (BSA) (Sigma) | | | | 0,144 g | |
| Taurine (Sigma) | | | | 0,0300 g | |
| Pénicilline Streptomycine Glutamine (0,5 mg/ml) (Invitrogene) | 5,5 ml | 5,5 ml | 5,5 ml | | 6,5ml |
| Sodium Pyruvate (0,5 mol/ml) (Gibco) | | | | | 6,5 ml |
| Non Essential Amino Acids (NEAA) (0,5 mmol/ml) (Invitrogene) | 5,5 ml | 5,5 ml | 5,5 ml | | 6,5 ml |
| βmercaptoethanol 50 μmol/ml (Invitrogene) | 1,3 ml | 1,3 ml | 1,3 ml | | 1,3 ml |
| LIF 10000 U/ml | | | | | +/- 2 μl.ml ⁻¹ |
| Tamoxifène 1 mM | | | | | +/- 0,2 μl.ml ⁻¹ |

IV.1.2. Préparation des cellules nourricières (MEF)

Les rbESC sont cultivées sur des MEF dans des boîtes gélatinées. Les MEF ont été préalablement préparés à partir d'embryons de souris de 10 à 12 jours post-fécondation des souches CF1, CD1 ou OF1 et congelés après une courte amplification de 2 passages en tube de 1.10^6 cellules. La dérivation des MEF est réalisée par dissection des fœtus en éliminant la tête et les viscères. Les carcasses ainsi récupérées sont rincées deux fois au Phosphate Buffer Saline (PBS, Gibco by Life 14200-075). Elles sont ensuite découpées en petits morceaux à l'aide d'un scalpel puis incubées dans 5 mL de Trypsine/EDTA 1x (Gibco by Life 15400-054) pendant 30 minutes à 37°C et 5% de CO₂. Après 30 minutes les agrégats sont récupérés à l'aide d'une pipette P1000 et une dernière dissociation est réalisée par aspiration/refoulement. Le résultat de la dissociation de chaque fœtus est transféré dans un tube falcon de 50 mL chacun comportant 45 mL de milieu de culture pour MEF (tableau II) afin d'inhiber l'action de la trypsine. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 min à 315 g et chaque culot est resuspendu avec 10 mL de milieu. Ces 10 mL sont transférés dans une boîte de 100 mm (Corning 430167) et correspond au premier passage cellulaire (P1). Le milieu est changé tous les jours et lorsque les cellules sont confluentes, elles sont trypsinées et réensemencées au 1/4 dans de nouvelles boîtes correspondant au P2. A confluence, à nouveau, elles sont trypsinées (P3) pour être congelées. Les MEF sont alors comptés, resuspendus dans un volume de milieu MEF pour avoir une concentration finale de 7 à 10.10^6 cellules/mL. Un volume de milieu de congélation froid (80% FBS et 20% diméthylsulfoxyde (DMSO, sigma-aldrich D2650), est ensuite ajouté goutte à goutte pour éviter les chocs osmotiques. Puis on répartit 1 mL de suspension cellulaire par cryotube que l'on dispose dans une cryobox nalgène qui est mise au congélateur -80°C. Après 48h, les MEF sont conservés plusieurs mois dans l'azote liquide (-196°C). Un stock important de cellules MEF est préparé afin de pouvoir utiliser le même lot pour les cultures de rbESC. Chaque semaine, un tube de MEF est décongelé avec 6 ml de milieu de culture gouttes à gouttes pour éliminer le DMSO sans faire de choc osmotique. Puis les cellules sont centrifugées 5 min à 315 g, resuspendues et ensemencées dans une à trois boîtes Corning® de 100 mm et incubées 48h à 72h à 37°C et 5% de CO₂. La préparation des cellules nourricières est réalisée en stoppant leur croissance avec de la mitomycine C, une drogue qui bloque leurs fuseaux mitotiques sans les tuer. Pour cela les MEF sont incubés avec 5 µg/ml de mitomycine C pendant 2 à 3h, rincés 5 fois avec du PBS, dissociés à l'aide de trypsine 1X, centrifugés 5 min à 315 g, comptés sur une cellule de Malassez et ensemencés dans des boîtes et/ou des plaques préalablement incubées avec de la gélatine à 0,01 % pendant 20 min à température ambiante, à la concentration de $1,6.10^4$ cellules/cm².

IV.1.3. Dérivation et amplification des fibroblastes issus de peau

Les fibroblastes ont été dérivés à partir de biopsies d'oreille de lapin d'environ 5 mm². Les morceaux de peau ont été nettoyés, rincés au PBS 1X-5% Pénicilline/Streptomycine/Glutamine (0,5 mg/ml) (PSG), découpés finement au scalpel, et traités deux fois avec de la trypsine 10X pendant 30 min à 37°C. Après une centrifugation de 5 min à 314 g, les cellules isolées et les morceaux de tissus ont été resuspendus dans le milieu DMEM-20% FBS et mis en culture à 37°C à 5% de CO₂. Après une semaine de culture, les cellules qui s'amplifient à partir des explants sont dissociées à l'aide de trypsine 2X et amplifiées par

deux passages successifs en milieu rbF avant d'être congelées dans 90% FBS + 10% DMSO et stockées dans des conteneurs d'azote liquide.

IV.1.4. Obtention et mise en culture d'embryons de lapin

Pour produire les embryons, on utilise des lapines de race New Zealand White. Afin d'augmenter le nombre d'embryons récoltés par lapine, on induit une super-ovulation chez les femelles avant de les mettre en reproduction avec les mâles transgéniques hSTAT3-ER^{T2}. La procédure consiste à faire 5 injections sous-cutanées à 12h d'intervalle respectivement de 0,5 mL, 0,5 mL 1 mL, 1 mL et 0,5 mL de Stimufol® (pFSH ou Follitropine porcine à 9 µg/ml et pLH ou Lutopine porcine à 1,8 µg/ml). L'ovulation est induite 12h après la dernière injection de Stimufol par une injection intramusculaire de 0,2 mL de Receptal® (Acétate de Buséréline, analogue de la GnRH, à 4 µg/ml) et les accouplements naturels sont réalisés en laissant un mâle et une femelle ensemble dans une même cage pendant 1h. Les lapines sont euthanasiées 60h après la fécondation pour obtenir des morulas compactées. Pour cela, les lapines sont étourdiées par percussion de la boîte crânienne, puis saignées jusqu'à leur arrêt cardiaque. Après ouverture de la paroi abdominale, l'appareil reproducteur (utérus, oviductes et ovaires) est prélevé. Les cornes utérines sont ensuite perfusées avec 5 à 10 mL de PBS additionné de 10% FBS (Sérum de veau foetal) et de 1% PSG (Penicilline/Streptavidine/Glutamine), en insérant une seringue dans le pavillon de l'oviducte pour récupérer le liquide contenant les embryons qui sort à l'autre extrémité de la corne utérine. Le nombre d'embryons obtenus par lapine super-ovulée varie entre 25 et 30 et peut atteindre 60. Les embryons sont récupérés à l'aide d'une pipette à bouche, rincés deux fois dans du milieu RDH (Tableau II) et mis en culture à 38°C et 5% CO₂. Après 24h de culture les embryons ont atteint le stade jeune blastocyste et peuvent être utilisés pour dériver des rbESC.

IV.1.5. Dérivation de rbESC à partir d'embryons de lapin

La dérivation de rbESC consiste en la mise en culture du bouton embryonnaire (ou ICM) de blastocystes à E3.5/E4 et débute par l'élimination du manteau muqueux. Ce manteau est spécifique aux embryons de lapin et nécessaire *in vivo* à l'implantation des embryons dans la cavité utérine. Il est éliminé par un traitement enzymatique à la pronase (Sigma Aldrich P5147, 5 mg/mL). Pour cela, les embryons sont rincés 3 fois dans des gouttes de PBS-BSA pour éliminer toutes traces de sérum, puis ils sont incubés dans la pronase pendant 6 min à 37°C. Ils sont alors rincés de nouveau 3 fois dans des gouttes de milieu RDH en utilisant des capillaires de verre de la taille des embryons (soit environ 100 µm) qui permet d'éliminer le manteau fragilisé par la pronase. Les embryons sont ensuite déposés dans des puits de culture contenant des cellules nourricières et du milieu USLT (tableau II) (1 embryon par puits de boîte Nunc à 4-puits) et mis en incubation à 38°C, 5% CO₂ et 5% O₂ pendant 12h, soit le temps nécessaire pour qu'ils éclosent de leur membrane pellucide. Les embryons sont alors disséqués mécaniquement, sous microscope, à l'aide de capillaires en verre légèrement plus petit que la taille de l'embryon (soit 75 µm). Par des séries d'aspiration/refoulement, les ICM sont dégagés des trophoblastes qui sont éliminés, puis les plaques de cultures sont remises en incubation en attendant que les ICM adhèrent aux cellules nourricières et se développent (figure 10). Au bout de 4 à 5 jours,

les ICM ont formé des excroissances de petites cellules serrées sur des parterres de cellules différenciées de type épithélial. Les excroissances sont alors découpées en clumps et repiquées mécaniquement dans un autre puits de plaque 4-puits, c'est le 1er passage (P1). Après encore 2 à 3 jours, les cellules qui ont formées de colonies sont repiquées par action de la trypsine (Trypsine 1X 5 min à 37°C), centrifugées en présence de milieu USLT, resuspendues dans du milieu frais et placées dans un puits de plaque 12-puits contenant des MEF, c'est le passage P2. Après 5 à 6 jours, les cellules ont reformé des colonies qui sont de nouveau trypsinées et placées dans un puits de plaque 6-puits (P3). A ce stade, les cellules commencent à s'adapter à la culture et croissent de façon plus régulière, elles sont donc passées environ tous les 3 jours par dissociation enzymatique à la trypsine.

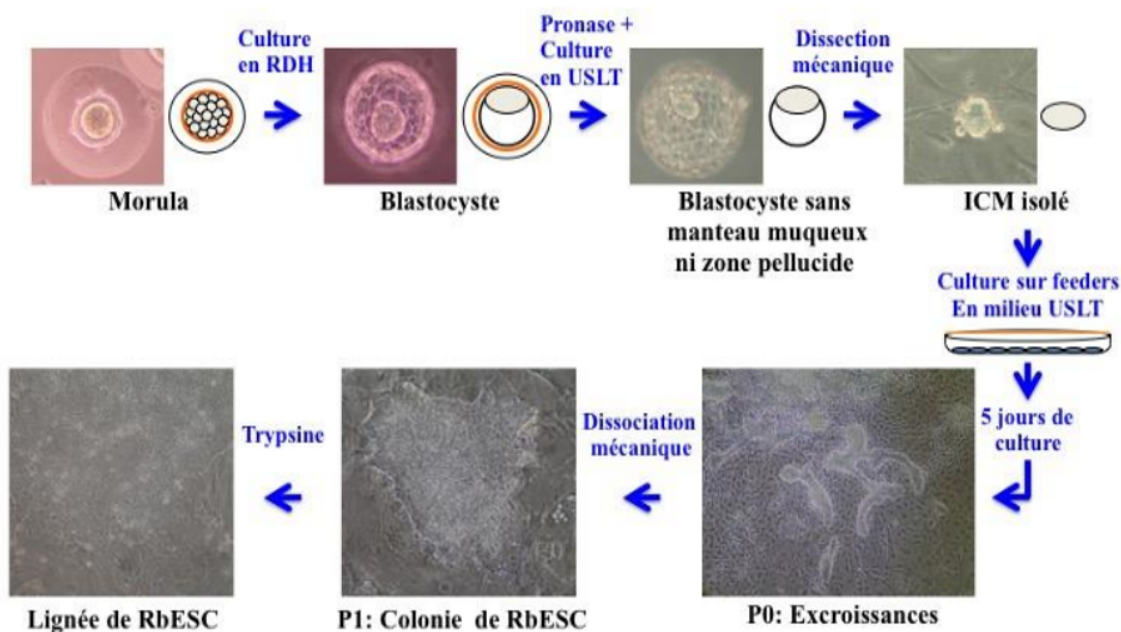


Figure 10 : Schéma illustrant les différentes étapes de la dérivation des rbESC

IV.1.6. Micro-injection de rbESC dans des embryons hôtes

Afin de vérifier les capacités de colonisation des nouvelles lignées de rbESC, les cellules sont transduites par un vecteur lentiviral exprimant la protéine fluorescente GFP sous le contrôle du promoteur fort et ubiquitaire CAG. Pour cela, 40000 cellules sont mises en contact avec 20 μ L de virus concentré ayant un titre de 10^7 particules infectieuses/mL, pour obtenir une MOI (Multiplicity Of Infection) de 5, sur matrigel (une matrice extracellulaire synthétique) pendant 12h à 37°C, 5% CO₂ et 5% O₂. Les cellules sont ensuite rincées et maintenues en culture pendant 5 jours avant d'être passées sur cellules nourricières et amplifiées. Les cellules exprimant la GFP sont alors triées par cytométrie en flux, pour obtenir une culture de cellules homogènes et exprimant toutes le marqueur fluorescent. Le tri a été réalisé par la plateforme de la SFR Biosciences de Lyon Gerland. La veille des micro-injections, des embryons au stade 4/8 cellules (E1.5) sont récupérés, puis mis en culture 24h en milieu RDH jusqu'au stade morula, afin de pouvoir réaliser les micromanipulations sur des embryons présentant un manteau muqueux peu épais. Les rbESC-GFP+ sont alors trypsinées pour être parfaitement individualisées, et 6 à 8 cellules sont placées entre les blastomères et la membrane pellucide à l'aide d'un capillaire de 20 μ m monté sur un micromanipulateur. Les embryons sont remis en culture pendant 24h dans un milieu mixte 50% RDH – 50% USLT, traités à la pronase pour éliminer le manteau muqueux, cultivés 24h de

plus, puis fixés en PFA 2%. Les embryons sont alors analysés par un double immuno-marquage avec des anticorps anti-GFP et anti-Oct4 afin de détecter la présence des cellules micro-injectées et vérifier leur pluripotence. Les micro-injections et les marquages embryonnaires ont été réalisés par Anaïs Moulin, Ingénieur d'étude dans notre équipe.

IV.1.7. Test de différenciation cellulaire

Pour évaluer la dépendance des rbESC au LIF ou au tamoxifène (Tax), les cellules ont été cultivées dans différentes conditions avec ou en absence de ces deux molécules. Les cellules ont étéensemencées, soit sur du matrigel, soit sur des cellules nourricières dans le milieu US selon les combinaisons suivantes : UST (+ Tax), USL (+ LIF), US LT (+ Tax & LIF) et US (- Tax & LIF). Les cultures ont été maintenues dans ces milieux pendant 3 à 5 passages afin de vérifier la différenciation des cellules dans chaque condition.

IV.1.8. Transfection cellulaire

Les cellules 293FT sont transfectées à l'aide de phosphate de calcium. La veille, les cellules sontensemencées à raison de 1.10^6 cellules dans 4 mL par boîte de 60 mm². Les précipités de phosphate de calcium sont obtenus en ajoutant gouttes à gouttes un mélange d'ADN plasmidique (10 µg) et de chlorure de calcium 2M dans un tampon Hepes préparé extemporanément (10 % HBS 10X + 2 % Phosphate Buffer + 1,5 % NaOH 1N + 86,5 % H₂O). La solution est ensuite incubée 20 minutes à température ambiante puis déposée sur les cellules 293FT. Les cellules sont cultivées pendant 48h en présence ou non de tamoxifène (250 nmol.L⁻¹ final).

IV.1.9. Préparation de culots secs cellulaires

Les culots secs cellulaires sont préparés pour les analyses génomiques ultérieures. Cette technique permet de conserver les cellules sans dégrader leurs acides nucléiques. Les rbESC sont dissociées par la trypsine, centrifugées 5 min à 314 g, transvasées dans des tubes eppendorf de 2 mL et rincées deux fois au PBS. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est immédiatement congelé dans de la carboglace et puis stockés à -80°C.

IV.2. Production et caractérisation des lignées de lapins transgéniques

IV.2.1. Vecteurs utilisés

Les lignées de lapins transgéniques inducteurs de pluripotence ont été obtenues par la technique classique de micro-injection d'ADN nu dans le pronucleus mâle de zygote. Les plasmides vecteurs utilisés ont été construits par Nathalie Doerflinger, Ingénieur de recherche dans l'unité, et sont basés sur la structure des vecteurs de transgénèse de la société TRM (Transgenic Rabbit Models). Les effets potentiels des positions du Tag V5 et des séquences ER^{T2} par rapport au gène *hSTAT3* sur l'expression de la protéine ont été préalablement testées par Western-Blot, après transfection des constructions dans des cellules 293FT. Ce travail a fait l'objet du stage de L2 ESTBB de Loreane Tardy et n'a pas montré de variation d'expression selon les constructions. Les structures des transgènes *V5-hSTAT3-ER^{T2}* et *V5-ER^{T2}-hSTAT3-ER^{T2}* ont donc été choisies et clonées en aval du promoteur ubiquitaire CAG dans le vecteur de transgénèse pour produire les vecteurs 372b et 373.3 qui ne diffèrent que par le nombre de séquences ER^{T2} (figure 9). Les vecteurs ont été linéarisés et leur ADN a été purifié pour être micro-injecté dans des ovocytes fécondés.

IV.2.2. Obtention des différentes générations

Les micro-injections d'ADN nu dans le pronucleus mâle de zygotes ont été réalisées par Anaïs Moulin et Edwige Delahays, deux Ingénieurs d'étude de notre laboratoire. Entre 6 et 10 embryons ont ensuite été immédiatement transplantés dans chaque oviducte de femelles pseudo-gestantes anesthésiées. Ces expériences ont été réalisées dans les locaux de la société HyPharm, une société productrice de lapin partenaire du projet. Après 29 à 31 jours de gestation, les lapines porteuses ont mis bas et une biopsie de 1 mm² à l'extrémité de la queue a été réalisée sur chaque lapereau, afin de les génotyper par PCR (figure 11). A la puberté, les lapins F0 génotypés positifs et mosaïques pour le transgène *hStat3-ER^{T2}* ont été croisés avec des femelles ou des mâles sauvages afin de produire la génération F1. Les lapereaux F1 ont également été génotypés à partir d'une biopsie de queue. Les femelles F1 transgéniques ont été utilisées pour la production d'embryons qui ont été congelés et conservés dans le Cryobanque Nationale Lapin. Les mâles F1 transgéniques hétérozygotes ont subi une biopsie de peau d'oreille afin de réaliser des cultures primaires de fibroblastes et de vérifier l'expression activable de la protéine exogène. Ils ont également été croisés avec des femelles sauvages pour vérifier leur taux de fertilité.

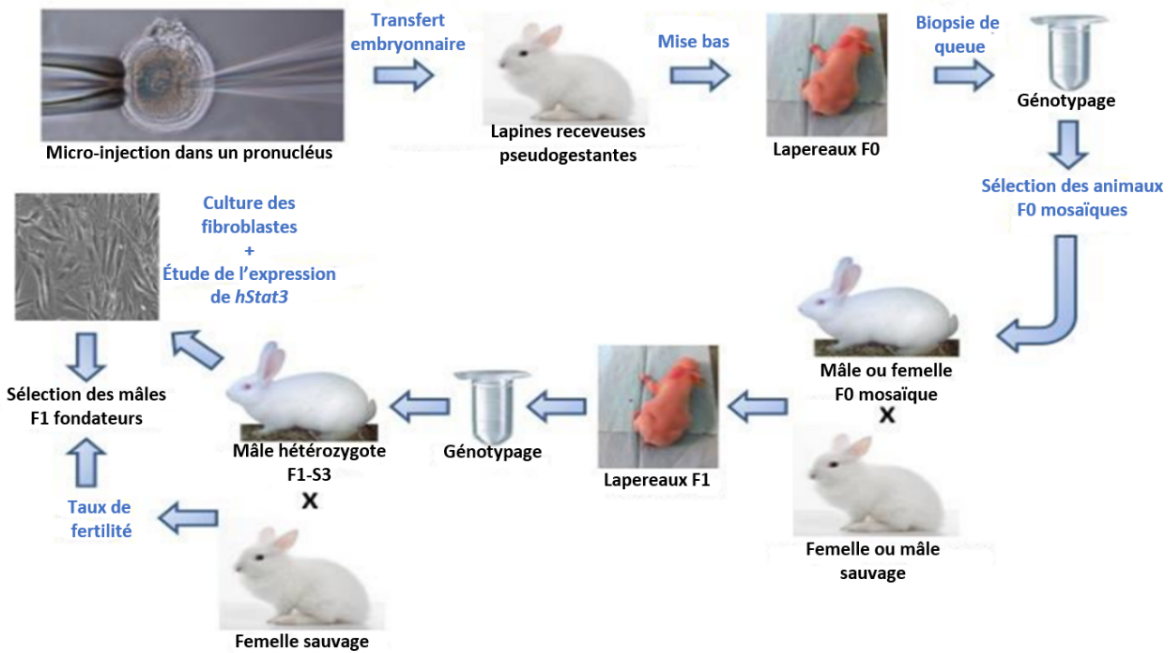


Figure 11 : Stratégie de création des lignées de lapins transgéniques inducteurs de pluripotence

Quatre mâles F1 issus de 4 animaux F0 différents et donc de quatre événements indépendants d'intégration du transgène ont été sélectionnés comme mâle reproducteurs : deux pour chaque vecteur avec des niveaux d'expression faible et élevé de la protéine hStat3-ER^{T2}. Ces mâles ont été transférés dans l'animalerie de notre laboratoire et les études de ce mémoire ont été réalisées sur des embryons F2 issus des croisements de ces 4 mâles avec des femelles sauvages. Au cours de mon stage, deux de ces mâles sont morts et j'ai donc mis en reproduction les deux restants pour obtenir des descendants F2 et éviter de perdre les lignées transgéniques. J'ai donc réalisé le génotypage et le sexage des lapereaux F2 nés dans notre animalerie.

IV.2.3. Génotypage des lapereaux

Le génotypage est réalisé à partir de l'ADN extrait de biopsies de queue des lapereaux d'un jour. Les fragments de queue d'environ 1 mm² sont traités avec de la protéinase K (P6556 Sigma) (0,5 mg.mL⁻¹) diluée dans un tampon de lyse contenant du tris-HCl à pH8 (50 mmol.L⁻¹), de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) à pH8, du NaCl (100 mmol.L⁻¹) et 1% de dodécylsulfate de sodium (SDS). La lyse est faite pendant une nuit sous agitation à 56°C. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés 10 min à 273 g pendant 5 min pour éliminer les débris tissulaires, puis l'ADN est précipité avec 50 µL de NaAc (3 mol.L⁻¹, pH7) et 1 mL d'éthanol 100%. Après centrifugation à 4°C et 273 g pendant 15 min, les culots sont rincés à l'éthanol 70%, séchés dans un bloc chauffant à 62°C, puis resuspendus avec de l'eau ultrapure (UP). L'ADN est alors dosé au NanoDrop et les concentrations sont ajustées entre 100-200 ng.µL⁻¹. La présence du transgène *hSTAT3* ou du gène *SRY* localisé sur le chromosome Y des lapereaux mâles est détectée par PCR selon le protocole détaillé plus loin.

IV.3. Techniques de biologie cellulaire et moléculaire

IV.3.1. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée à partir de culots secs cellulaires à l'aide du kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen 69504). La première étape de l'extraction consiste à éliminer les protéines en incubant les cellules resuspendues dans du PBS avec de la protéinase K pendant 10 min à 56°C. On précipite ensuite l'ADN avec de l'éthanol 100% et on place le précipité sur une colonne de silice qui retient l'ADN. Après deux rinçages de la colonne, l'ADN est élué avec 100 à 200 µL d'eau UP. Les échantillons sont dosés par spectrophotométrie à l'aide d'un nanodrop et dilués pour avoir une solution d'ADN à 50 ng/µL.

IV.3.2. Extraction d'ARN

Les ARN totaux sont extraits à partir des culots secs cellulaires préparés au préalable en culture. Pour cela, les cellules sont lysées dans le tampon du Kit d'extraction RNeasy Minikit (Qiagen 74106) puis déposées sur une colonne de purification QIAshredder (Qiagen 79656). Le produit de la purification est récupéré et précipité avec un volume d'éthanol 70% à -20°C. Les acides nucléiques ainsi précipités sont fixés sur une colonne de silice, puis lavés pour enlever les traces d'éthanol. Ensuite une DNase I (Qiagen 79254) est appliquée sur la colonne pendant 15 min à température ambiante pour éliminer l'ADN. Plusieurs lavages de la colonne sont ensuite réalisés pour éliminer l'éthanol, l'ADN et les protéines avant d'éluer les ARN totaux avec 30 µL d'eau RNase free. Les ARN sont alors dosés au spectrophotomètre (Nanodrop 2000). Puis 500ng d'ARN sont rétrotranscrits en ADNc avec le kit High capacity RNA-to-cDNA (4387406, Thermo Fisher Scientific,) en suivant le protocole recommandé par le fabricant. Ce kit permet de rétrotranscrire les ARN messagers grâce à une amorce polyT qui se fixe sur les séquences polyA des ARNm.

IV.3.3. Extraction de protéines

Les protéines sont extraites à partir des culots secs cellulaires à l'aide d'un tampon de lyse RIPA contenant du Tris HCL pH8 (50 mmol.L⁻¹), 0.1% SDS (Sigma-aldrich 71736), 0.5% deoxycholate de sodium (Sigma-aldrich D6750), 1% IGEPAL/NP40 (Sigma-aldrich 18896), NaCl (150 mmol.L⁻¹), 0.04% phenylmetanesulfonyfluoride (Fluka 76307), Leupeptine (Sigma-aldrich L8511) (10 µmol.mL⁻¹), complete protease inhibitors (1 comprimé pour 50 mL final). Les échantillons sont incubés pendant 2h à 4°C sous agitation, puis centrifugés à 4°C 30 min à 315 g. Les surnageants protéiques sont récupérés et maintenus dans de la glace. Les concentrations en protéine sont ensuite dosées par la méthode de Bradford au Bleu de Coomassie (Plus Protein Assay Reagent 232361856210). Le dosage colorimétrique est effectué par spectrométrie en se basant sur une gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) à 2mg.mL⁻¹.

IV.3.4. PCR sur ADN génomique

La présence du transgène est détectée par Polymerase Chain Reaction (PCR) en utilisant des amorces qui ne peuvent pas s'hybrider sur le gène endogène *rbStat3*, car elles amplifient un fragment de 994 bp situé à la jonction du transgène *hSTAT3* et de la séquence *ERT²*. Le mixte de réaction est composé de 10 µL de Quick master mix (Biolabs M0271L), contenant les dNTPs, le tampon et la Taq polymérase, auquel on ajoute 2 µL de chaque amorce à 50ng/µL, sens Scr-Stat-F (5'-GTCCCTCACCTTTGACATGG-3') et anti-sens Ampli-ERT2-R (5'-TCATCAGACTGTGGCAGGG-3') (Eurofins). La solution est déposée dans des plaques de 96 puits et 1 µL d'ADN est ajouté. Le contrôle positif de PCR est fait avec l'ADN du vecteur plasmidien utilisé pour produire les animaux transgéniques (vecteur 372b et 373.3) et le contrôle négatif avec un échantillon d'eau. En parallèle une PCR contrôle est réalisée pour vérifier la pureté des ADN en utilisant des amorces qui ciblent un gène de ménage de lapin *rbTBP* (rabbit-TATA Box Protein), à savoir les amorces sens rb-TBP-ADNg-F (5'-GGCCACGTTTAGGTCAAGTGT-3') et anti-sens rb-TBP-ADNg-R (5'-AATGCCCATGACTACCAAGC-3') (Eurofins) et qui donnent un fragment de 550 pb. De la même façon, le sexage des lapereaux ou des lignées de cellules peut être réalisé par PCR avec des amorces localisées sur le gène *SRY* du chromosome Y, à savoir OcSRY21F (5'-AGCGGCCAGGAACGGGTCAAG-3') et OcSRY23R (5'-CCTTCCGCGAGGTCTGTACTTG-3') qui amplifie un fragment de 250 bp. Dans ce cas, les contrôles positif et négatif sont respectivement de l'ADN d'un lapin mâle et d'une lapine. Le programme d'amplification est le suivant : une dénaturation de 5 min à 95°C, puis 35 cycles comprenant une dénaturation de 30 sec à 95°C, une hybridation de 30 sec à 55°C pour Stat3, 60°C pour TBP et 64°C pour SRY et une élongation de 30 sec à 72°C et une élongation finale de 5 min à 72°C. Les produits d'amplification PCR sont ensuite déposés sur un gel d'agarose à 1% ou 1,8% selon la taille attendue de l'amplicon.

IV.3.5. qPCR sur ARN cellulaire

Les ADNc sont dilués 5 fois et soumis à une qPCR avec des couples d'amorce amplifiant les ADNc des gènes *Oct4*, *hSTAT3-ERT²*, *c-Myc*, *Klf5*, *Klf4*, *Socs3*, *GP130*, *Cyp1b1*, *cFos* et *Tbp* (Eurofins Genomics) (Annexe 1). Les amplifications en temps réel sont réalisées avec le système StepOne plus de Thermo Fisher Scientific (S/N 2720005023). Les réactions sont réalisées en triplicats avec le Sybr Select Master Mix (4472908, Life Technologies) qui contient tous les composants nécessaires à une PCR quantitative tels que les nucléotides et l'enzyme, AmpliTaq® DNA Polymérase. Elles sont effectuées dans des plaques de 96-puits (4346906, Life Technologies) avec 9 µL d'un mixte contenant 3,5 µL d'H₂O UP + 5 µL de Sybr Select Master Mix + 0,5 µL du mélange d'amorces sens et anti-sens à 10 µM, et auquel est ajouté 1 µL de l'échantillon. Les échantillons subissent les cycles d'amplification suivants à l'aide d'un LightCycler 1.5 de Applied Biosystem :

- Cycle initial de dénaturation : 2 min à 50°C + 2 min à 95°C
- Cycle d'amplification (40X) : 15 sec à 95°C + 15 sec 60°C + 15 sec à 72°C
- Cycle de fusion : 15 sec à 95°C + 1 min à 60°C (Augmentation graduelle de la température tous les 0,3°C jusqu'à 95°C)

Les résultats sont normalisés par rapport aux amplifications obtenues pour le gène de ménage *rbTBP*, puis comparés entre eux par rapport à un des échantillons choisis comme référence.

IV.3.6. qPCR sur embryon unique

Les embryons récoltés au stade morula à E2.5 sont cultivés une nuit dans le milieu RDH jusqu'au stade morula compactée E3.0. Le manteau muqueux et la membrane pellucide sont alors éliminés par pronase selon le protocole décrit précédemment, puis remis en culture en présence de différentes molécules à tester. Après 48h de culture, les embryons sont récoltés un à un et placés individuellement dans des barrettes de tubes pour PCR avec 5 μ L de tampon du kit CellsDirect one-Step RT-qPCR kit (ThermoFisher) et immédiatement congelés à -80°C . Après décongélation des barrettes 15 sec à 50°C , 4 μ L d'un tampon de pré-amplification contenant les enzymes Superscript III/Platinum Taq et un mélange de 48 couples d'amorce à 200nM (Annexe 1) sont ajoutés à chaque échantillon. Les réactions de rétrotranscription et pré-amplification sont alors réalisées ensemble selon la séquence suivante : 15 min à 50°C , puis 2 min à 95°C , suivi de 20 cycles de 15 sec à 95°C + 4 min à 60°C . Les échantillons sont alors digérés par l'enzyme ExoSAP-IT pour dégrader les produits ADN restant, en ajoutant directement 3 μ L du mélange fourni par le kit par échantillon et en incubant les tubes 15 min à 37°C , puis 15 min à 80°C . Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C . Les amplifications finales sont ensuite réalisées après dilutions des échantillons 20X selon le protocole de qPCR décrit précédemment avec les couples d'amorces choisies et présentes dans le mélange de pré-amplification sur un appareil LightCycler 1.5.

IV.3.7. Immuno-marquages

L'étude de l'expression du transgène *hSTAT3-ER^{T2}* est réalisée sur des fibroblastes issus de biopsie de peau d'animaux transgéniques, sur des embryons au stade blastocyste ou sur des rbESC en cours de dérivation. Pour cela on utilise des anticorps anti-Stat3 détectant les protéines à la fois humaines et de lapin, anti-V5 marquant uniquement les protéines transgéniques humaines STAT3, et anti-Oct4 détectant une protéine de pluripotence. Les fibroblastes ou les rbESC sontensemencés dans des plaques de 24-puits à la densité de $0,4 \cdot 10^5$ cellules/500 μ L/puits. Les cellules sont ensuite traitées ou non avec du tamoxifène pendant 6h, puis fixées avec 2% de paraformaldéhyde (PFA) et conservées à 4°C jusqu'au marquage. Les cellules sont rincées au PBS et perméabilisées avec 0,4% triton-PBS 1X pendant 20 min. Ensuite elles sont incubées 1h avec la solution de blocage composée de 10% de sérum de chèvre (sigma G9023) ou d'âne (sigma D9663) dans du PBS 1X, puis 1h avec les anticorps primaires : un anticorps de souris anti-V5 (46-0705, Invitrogen) dilué au $1/250^{\text{ème}}$, un anticorps de souris anti-Stat3 (124H6, Cell Signaling Technology) dilué au $1/800^{\text{ème}}$ ou un anticorps de lapin anti-Oct4 (sc-9081, Santa Cruz) dilué au $1/300^{\text{ème}}$ dans la solution de blocage. Après 4 lavages de 3 min au PBS 1X – 0,1% Tween, l'anticorps secondaire, un anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplées au fluorochrome Alexa Fluor 488 (A11001, life technologies) dilué au $1/400^{\text{ème}}$ ou un anticorps d'âne anti-IgG de lapin couplées au fluorochrome Alexa Fluor 555 (A31572, life technologies) dilué au $1/300^{\text{ème}}$ est rajouté durant 1h à l'obscurité. Après de nouveau 4 rinçages au PBS-Tween, les noyaux cellulaires sont marqués à l'aide de

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (5 ng/mL) (Sigma B2261) pendant 10 min, puis rincés par 4 lavages de 5 min en PBS 1X. Toutes les incubations sont faites sous agitation. L'observation des cellules est réalisée sous un microscope à fluorescence Nikon TSi. Le marquage des embryons est réalisé avec le même protocole sur des blastocystes sans manteau, dépellucidés et fixés au PFA2%. La perméabilisation est réalisée pendant une nuit dans du PBS-1%Tween à 4° C sous agitation. Puis le marquage est réalisé simultanément avec les deux anticorps primaires anti-Oct4 et anti-V5.

IV.3.8. Western Blot

Les concentrations de chaque échantillon sont ajustés à 100 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ avec du RIPA et du tampon de dépôt Laemmli 5X (composé de Tris HCL pH 6,8), dénaturées dans un bain-marie sec à 100°C pendant 5 min puis maintenues dans la glace. Les protéines sont séparées par la technique de SDS-page sur des gels de polyacrylamide à 10% (Mini-protean TGX stain-free gels BioRad) en condition dénaturante, puis transférées sur des membranes de nitrocellulose à l'aide d'un courant électrique (Trans-blot Turbo Transfer system BioRad). Les membranes sont ensuite saturées avec une solution de PBS-5% lait pendant 1h, puis hybridées avec des anticorps primaires monoclonaux anti-V5 (Novex 1658817 Invitrogen 46-0705 dilué au 1/1000^{ème}), anti-Stat3 (mouse monoclonal IgG BD 610190 dilué au 1/2000^{ème}) et anti-Actine (mouse monoclonal MA5-11869 ThermoFisher dilué au 1/400^{ème}) à 4°C pendant une nuit. Après rinçage des membranes 3 fois 10 min dans du PBS-lait, elles sont incubées avec l'anticorps secondaire, un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Peroxydase-conjugated AffiniPure Goat anti-mouse IgG, 114094, Jackson ImmunoResearch). La révélation des protéines hybridées est réalisée à l'aide d'un kit Biorad (Clarity Western ECL Substrate 170-5061) qui permet la détection de la peroxydase grâce à un substrat lumineux, le luminol. L'observation des membranes est réalisée grâce un appareil de détection de la bioluminescence (ChemicDoc MP Imaging System BioRad).

V. RESULTATS

V.1. Les lignées de lapins transgéniques

La production des deux lignées de lapins transgéniques porteurs des vecteurs 372b et 373.3 a été réalisée avant mon arrivée au laboratoire. Les constructions plasmidiques intermédiaires véhiculant les deux formes du transgène *hSTAT3ER^{T2}* avaient été testées précédemment en Western Blot après transfection dans des cellules 293FT. Puis les vecteurs de transgénèse définitifs avaient été micro-injectés dans des ovocytes fécondés, eux-mêmes transplantés dans des lapines pseudo-gestantes pour produire la génération de lapereaux F0. Mon travail a commencé avec la production et le test de la génération F1, ainsi que par une vérification de l'expression correcte des vecteurs de transgénèses.

V.1.1. Vérification de l'expression correcte des vecteurs de transgénèse

L'expression des protéines V5-hSTAT3-ER^{T2} du vecteur 372b et V5-ER^{T2}-hSTAT3-ER^{T2} du vecteur 373.3 a été vérifiée par Western Blot sur les protéines extraites de cellules 293FT transfectées au phosphate de calcium avec ces deux vecteurs de transgénèse et cultivées 48h en présence ou absence de tamoxifène. Deux anticorps ont été utilisés, un anti-Stat3 qui reconnaît à la fois les protéines endogène et exogène et un anti-V5 spécifique des protéines hSTAT3 transgéniques. Enfin, une réhybridation des membranes avec un anticorps anti-actine a permis de vérifier le dépôt homogène sur gel d'acrylamide et le bon transfert des protéines (Figure 12).

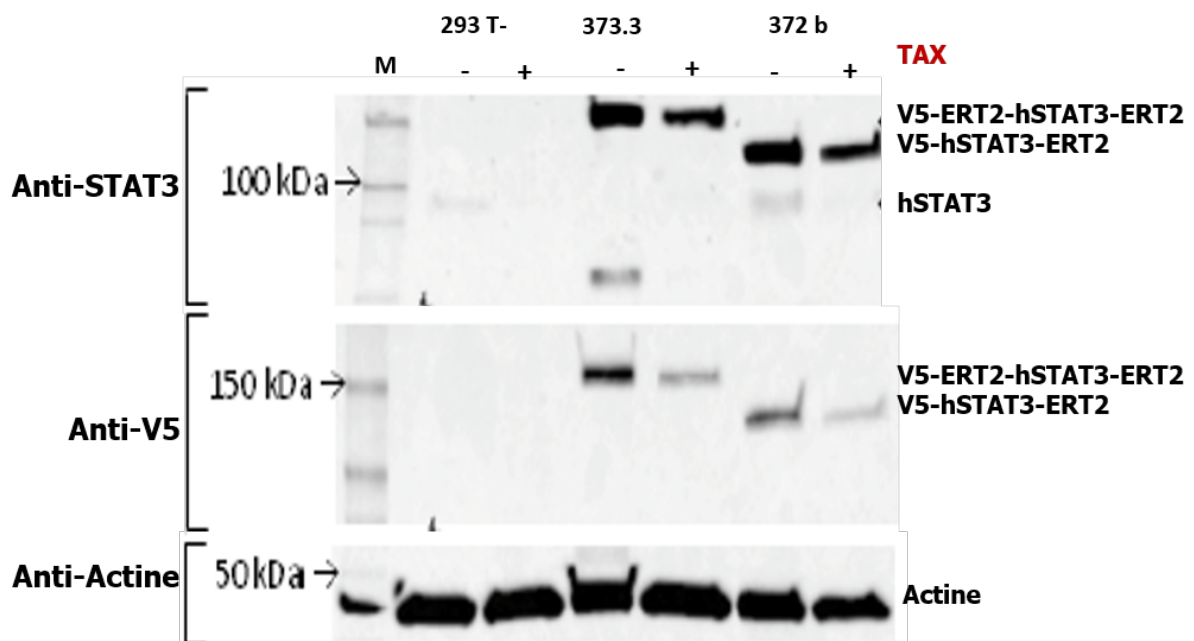


Figure 12 : Western Blot anti-Stat3, anti-V5 et anti-Actine réalisé sur des extraits protéiques de cellules 293FT non transfectées (cellules témoins) ou transfectées avec les vecteurs 373.3 ou 372b et cultivées en absence (-TAX) ou en présence (+TAX) de Tamoxifène à 100 nmol.L⁻¹. M : marqueur de taille.

On observe une faible expression de la protéine STAT3 endogène de PM 90 kDa même dans les cellules 293FT non transfectées témoin négatif. Par contre, les bandes de PM 120 kDa et 150 kDa correspondant respectivement aux protéines transgéniques taggées sont détectées uniquement dans les cellules transfectées. Les différences de taille entre les trois types de protéines correspondent bien à l'ajout du tag V5 et d'une ou deux séquences ER^{T2}. On remarque que l'expression des protéines transgéniques est identique voir même plus faible en présence de tamoxifène, mais cela est dû au fait que les conditions dénaturantes de la technique ne permettent pas de différencier la protéine inactive séquestrée par les protéines de stress, de la protéine activée et dimérisée. Le résultat confirme cependant l'expression attendue des protéines transgéniques à partir des vecteurs définitifs utilisés pour obtenir les animaux transgéniques.

V.1.2. La génération F0 et la transmission du transgène

La production et la caractérisation des lapins F0 ont été réalisées avant mon arrivée dans le laboratoire. Parmi les 163 lapereaux issus des 1324 embryons micro-injectés avec les vecteurs 372b ou 373.3, 8 se sont avérés positifs pour la présence du transgène après génotypage (Tableau III). Les pourcentages de lapereaux transgéniques obtenus sont respectivement de 4,2% et 5,4%.

Tableau III : : Résultat des expériences de transgénèse réalisées pour obtenir les lapins inducteurs de pluripotence exprimant le transgène *hSTAT3* sous deux formes : *V5-hSTAT3-ER^{T2}* (vecteur 372b) et *V5-ER^{T2}-hSTAT3-ER^{T2}* (vecteur 373.3).

| Vecteur micro-injecté | Nombre d'embryons micro-injectés | Nombre de lapereaux nés | % de naissance | Nombre de lapereaux hStat3+ | % de lapereaux chimériques | Numéro lapereaux F0 | Sexe Animaux F0 | Nombre Descendants F1 à tester |
|-----------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------|-----------------|--------------------------------|
| 372b | 622 | 72 | 11,6% | 3 | 4,2% | 4 | σ | 17 |
| | | | | | | 35 | φ | 15 |
| | | | | | | 36 | φ | 13 |
| 373.3 | 702 | 92 | 13,1% | 5 | 5,4% | 98 | σ | 17 |
| | | | | | | 121 | σ | 33 |
| | | | | | | 128 | σ | 19 |
| | | | | | | 156 | σ | 27 |
| | | | | | | 109 | φ | 12 |

Les 8 animaux F0 positifs ont ensuite été croisés avec des animaux sauvages afin de définir le taux de transmission du transgène et d'étudier l'expression du transgène chez leurs descendants transgéniques F1. En effet avec la technique de micro-injection d'ADN nu, bien que les injections du vecteur plasmidique soient réalisées au stage zygote, son intégration dans le génome hôte peut se produire plus tardivement au cours des divisions de segmentation. Les animaux F0 résultants sont donc mosaïques, c'est à dire formés de cellules ayant intégré le transgène dans leur génome et d'autres sans intégration. Il est donc important de tester les descendants F1 des animaux F0 mosaïques obtenus pour s'assurer que leurs cellules germinales sont bien issues de cellules ayant intégré le transgène et qu'ils sont donc capables de le transmettre à leurs descendants.

V.1.3. La génération F1 et l'expression du transgène

Au total, j'ai génotypé 153 lapereaux F1 issus des 8 animaux F0 mosaïques obtenus, ces descendants pouvant être soit négatifs, soit hétérozygotes pour le transgène. Pour cela, j'ai réalisé des amplifications PCR du transgène à partir de l'ADN extrait d'un fragment de queue des lapereaux d'un jour. Une PCR contrôle permettant d'amplifier un endogène de lapin *Tbp* est réalisée en parallèle pour s'assurer de la qualité des ADN. Les témoins positifs des réactions PCR, sont l'ADN plasmidien d'un des vecteurs de transgénèse pour les amplifications de *hSTAT3-ER^{T2}* et l'ADN de cellules de lapin sauvage pour *Tbp*. Les résultats d'une série de 8 échantillons sont présentés dans la figure 13 et l'ensemble des résultats est regroupé dans le Tableau IV.

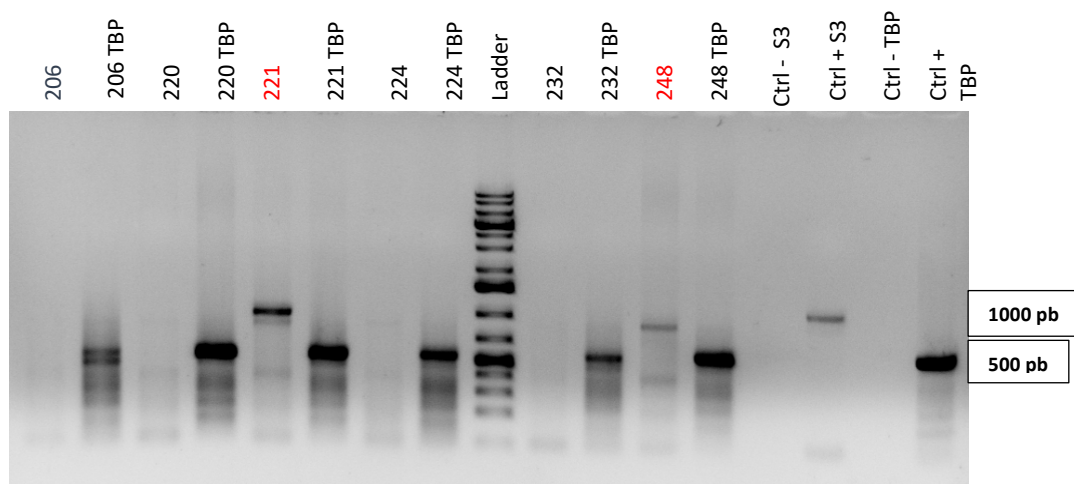


Figure 13 : Génotypage des lapereaux F1. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1% des réactions PCR spécifiques du transgène *hSTAT3* (amplicons d'environ 1000 pb) et de l'endogène *Tbp* (amplicons d'environ 550 pb). Marqueur de taille : Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder. Ctrl : contrôle. Les numéros des lapereaux positifs pour le transgène *hSTAT3* sont notés en rouge.

Tableau IV : Tableau récapitulatif des résultats de génotypage des 153 lapereaux F1

| Vecteur | Animal F0 (Père ou Mère) | Nombre de lapereaux testés | Numéro des lapereaux | Nombre de lapereaux F1 positifs | Numéro des lapereaux positifs | Taux de transmission |
|---------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--|----------------------|
| 372b | σ 4 | 17 | 246 à 253 296 à 304 | 6 | 246,248,249, 253 296,298 | 35% |
| | φ 35 | 15 | 191 à 205 | 7 | 191,194,195,197, 198, 202, 205 | 47% |
| | φ 36 | 13 | 178 à 190 | 10 | 178,179,180,181,182 183,184,185,187,188 | 77% |
| 373.3 | σ 98 | 17 | 278 à 295 | 1 | 281 | 6% |
| | σ 121 | 33 | 225 à 232 254 à 265 305 à 317 | 0 | | Pas de transmission |
| | σ 128 | 19 | 218 à 224 266 à 277 | 10 | 219,221,222,223,268 269,271,272,274,277 | 53% |
| | σ 156 | 27 | 206 à 217 318 et 319 | 0 | | Pas de transmission |
| | φ 109 | 12 | 166 à 177 | 5 | 166, 169, 172,175,176 | 42% |

La figure 13 montre que les ADN de six lapereaux F1 sont de bonne qualité puisque l'amplicon de 550 pb est bien présent. L'amplicon de 1000 pb révélant le transgène *hSTAT3-ER^{T2}* est présent dans 2 échantillons sur 6 : les mâles F1 221 et 248. Au total 39 lapereaux F1 sur 153 se sont révélés positifs pour le transgène. Six des 8 animaux F0 transmettent le transgène à leurs descendants, mais avec des taux très variables de 6% (mâle 98) à 77% (femelle 109). Les mâles F0 n° 121 et 156 ne transmettent pas le transgène. Aucune corrélation n'est à noter entre le vecteur injecté, le sexe du parent transgénique F0 et le taux de transmission.

Des fibroblastes des lapereaux mâles F1 trouvés transgéniques ont été mis en culture à partir de biopsie d'oreille, afin d'étudier l'expression du transgène en présence ou en absence de tamoxifène. La morphologie des cellules obtenues varie selon les échantillons avec un aspect soit très allongé et filiforme de type fibroblastique, soit un aspect pavimenteux et plus ovoïde de type épithélial (Figure 14).

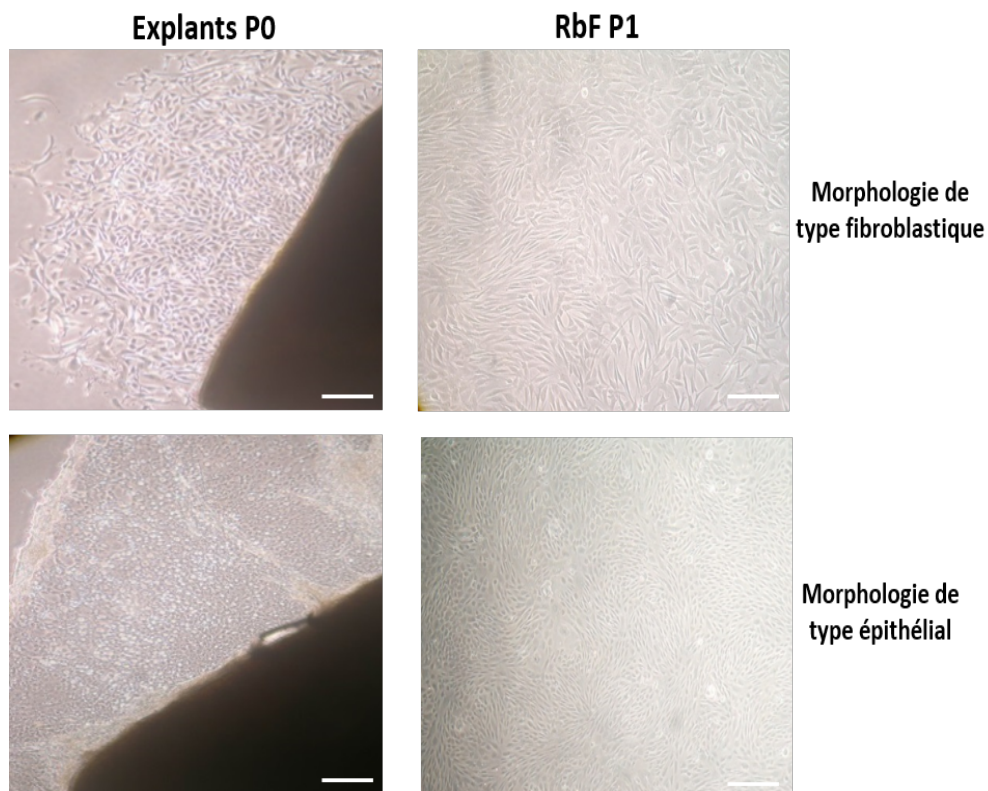


Figure 14 : Morphologie des rbF issus de biopsie d'oreille de lapereaux F1 transgéniques (RbF-hStat3). P0 : Mise en culture des explants, P1 : Premier passage des cellules obtenues. Barre d'échelle : 100µm.

De même la vitesse de dérivation et de croissance des cellules, ainsi que le nombre de passage obtenu avant leur entrée en sénescence diffèrent selon les échantillons, les cellules les plus robustes ayant la vitesse de croissance la plus élevée. Les caractéristiques des cellules obtenues semblent corrélées à la taille et la qualité de la biopsie, plutôt qu'à un effet quelconque du transgène. L'expression du transgène a ensuite été analysée par la technique d'immunofluorescence indirecte à l'aide des anticorps anti-Stat3 et anti-V5 après culture des rbF-Stat3 en présence ou en absence de tamoxifène à 200nmol.L⁻¹. Un exemple de résultat obtenu avec les rbF-Stat3 du mâle 248 est donné sur la figure 15.

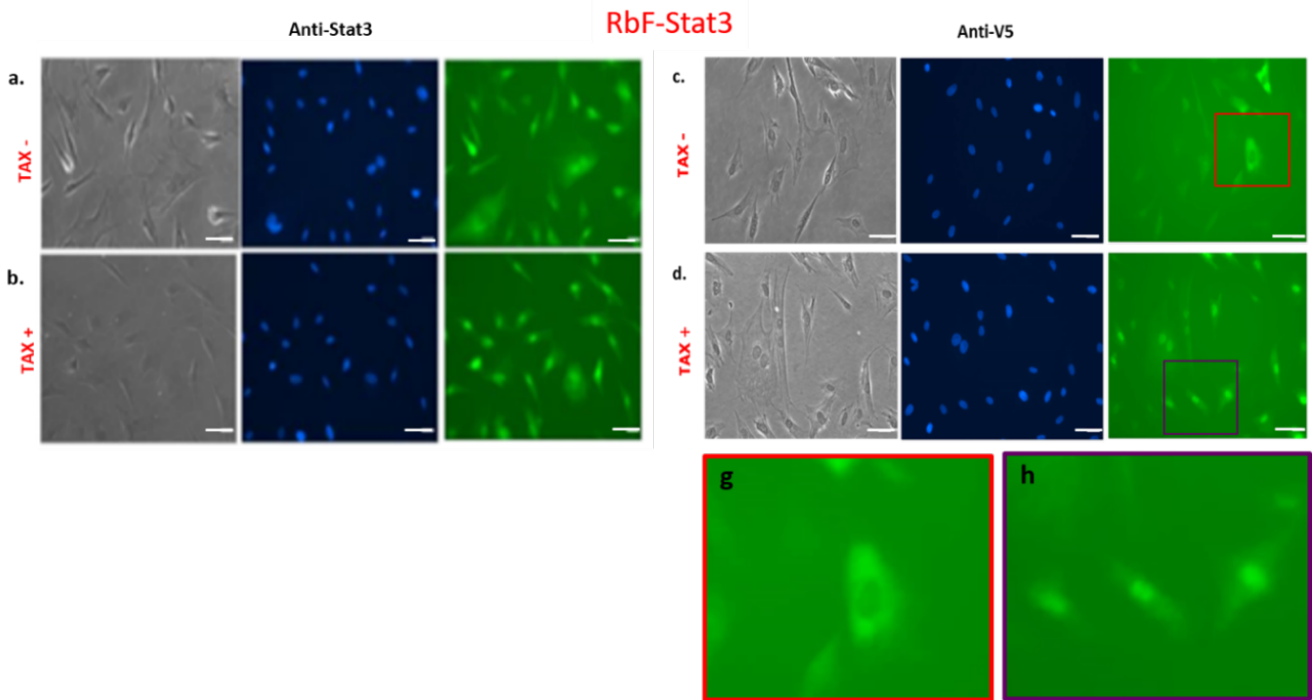


Figure 15 : Immunocytochimie indirecte sur fibroblastes du lapin transgénique 248 issu de la micro-injection du vecteur 372b (RbF-Stat3-248). A et B : anti-Stat3 ; C et D : anti-V5. A et C : culture en absence de Tamoxifène. B et D : culture en présence de tamoxifène à 200nmol.L⁻¹. G et H : agrandissement des zones signalées respectivement en rouge ou mauve. Barre d'échelle = 100 µm.

Les immuno-marquages des cellules issues de lapins transgéniques confirment l'expression des protéines Stat3, mais ne permet pas de distinguer l'expression de l'endogène de lapin du transgène humain, puisqu'aucune différence n'est visible entre les cellules traitées ou non au tamoxifène : le cytoplasme comme le noyau de toutes les cellules sont fluorescentes. En revanche l'anticorps anti-V5 est bien spécifique de la protéine transgénique hSTAT3-ER^{T2} et marque le cytoplasme des fibroblastes non traités au tamoxifène et le noyau des mêmes cellules traitées avec cet activateur. L'ensemble des résultats est donné dans le tableau V.

Tableau V : Tableau représentant les résultats d'expression du transgène chez les mâles F1

| Vecteur | Parent F0 | Mâle F1 | IF anti-V5 | Mâle F1 choisi |
|---------|-----------|---------|------------|----------------|
| 372b | F-35 | 191 | - | |
| | | 197 | - | |
| | | 198 | - | |
| | F-36 | 180 | + | X |
| | | 181 | - | |
| | | 182 | - | |
| | M-4 | 248 | + | X |
| | | 249 | + | |
| | | 296 | + | |
| | | 298 | - | |
| 373.3 | F-109 | 166 | - | |
| | | 169 | - | |
| | | 175 | + | X |
| | | 176 | - | |
| | M-98 | 281 | - | |
| | M-128 | 221 | + | X |
| | | 269 | - | |
| | | 274 | + | |
| 277 | | + | | |

Toutes les lignées des fibroblastes issues des 19 lapereaux mâles F1 positifs pour le transgène *hSTAT3-ER^{T2}* ont été testées et 8 d'entre elles, issues de 8 mâles descendants de 4 animaux F0 mosaïques différents, ont montré une expression activable du transgène par le tamoxifène. Parmi ces 8 mâles, quatre ont été choisis pour être les fondateurs des lignées transgéniques : les mâles n°175, 180, 221 et 248. Le choix a été basé sur trois critères : le vecteur de transgénèse utilisé (372b pour n° 180 et 248; 373.3 pour n°175 et 221), le parent F0 pour avoir 2 sites d'intégrations différents par vecteur (F-36 pour n°180 et M-4 pour n°248; F-109 pour n°175 et M-128 pour n°121), ainsi que taux d'expression du transgène (fort pour n°221 et 248 et plus faible pour n°175 et 180). Ce choix permet d'avoir des animaux fondateurs différents pour un même transgène afin de vérifier si les effets du transgène potentiellement visibles sont bien identiques quels que soient le vecteur, le site d'intégration et le taux d'expression du transgène. Notons cependant que par la suite, le mâle n°248 n'étant plus suffisamment efficace en reproduction, nous avons aussi utilisé ces deux frères (mâles 249 et 296) présentant probablement le même site d'intégration car étant issus du même mâle F0 (M-4).

V.1.4. Etude et obtention de la génération F2

Les quatre mâles hétérozygotes, fondateurs des lignées transgéniques 372b (transgène *V5-hSTAT3-ER^{T2}*) et 373.3 (transgène *V5-ER^{T2}-hSTAT3-ER^{T2}*), ont été mis régulièrement en reproduction avec des femelles sauvages dans notre animalerie, afin de produire des embryons pouvant être soit sauvages, soit hétérozygotes pour le transgène avec une proportion de 50%-50%. L'expression du transgène a donc été testée par immuno-marquage sur les premiers embryons obtenus avec les mâles fondateurs. Pour cela, les embryons récoltés au stade morula (E2.5) ont été cultivés pendant 48h en présence de tamoxifène jusqu'au stade blastocyste (E4.0) (Figure 16).

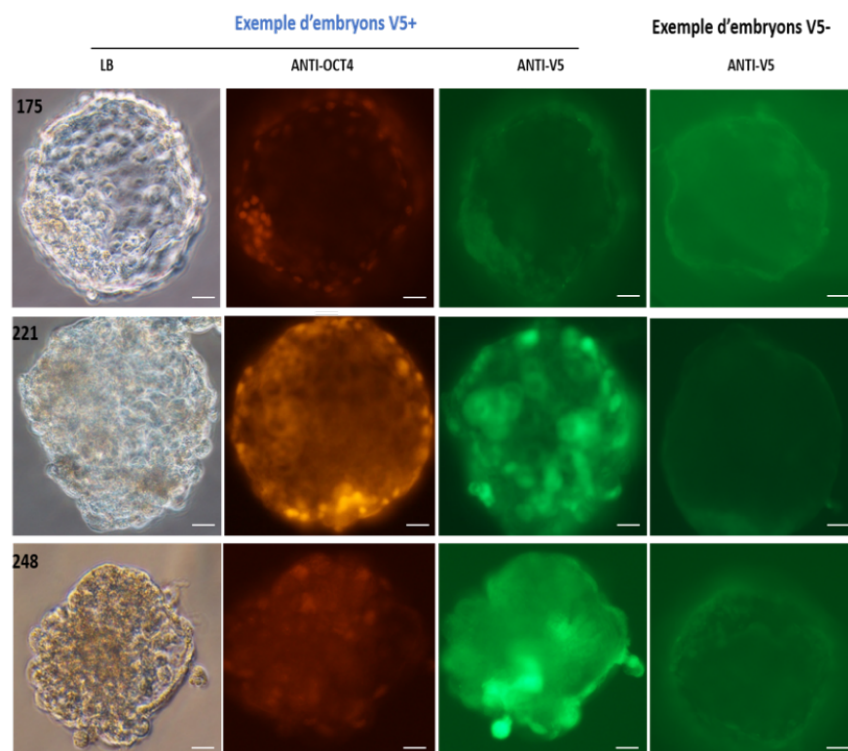


Figure 16 : Immunocytochimie indirecte sur des embryons de lapin issus des croisements entre un mâle F1 hétérozygote pour le transgène et une femelle sauvage. Barre d'échelle 10µm.

La figure 16 montre des embryons marqués par les anticorps anti-V5 ou anti-Oct4 en tant que témoin positif et des embryons négatifs pour l'expression du transgène. On retrouve bien au total la proportion attendue entre embryons positifs ou négatifs pour la présence de la protéine exogène, avec 22 embryons positifs sur 47 analysés (soit 47%). Cette proportion varie selon les pères avec 7 embryons positifs sur 9 pour le mâle 175 (78%), 9 sur 21 pour le mâle 221 (43%) et 6 sur 17 pour le mâle 248 (35%). Les marquages anti-Oct4 montrent une expression attendue de cette protéine de pluripotence dans l'ICM et le trophoctoderme. Il est à noter que la positivité des marquages anti-V5 dans les embryons issus du mâle n° 175 est souvent difficile à établir car le niveau d'expression du transgène est très faible, contrairement à celui des embryons issus des mâles 221 et 248. Il est aussi à noter que les embryons issus des croisements avec le mâle n°180 ont été perdus lors des marquages du fait d'une mauvaise manipulation.

Les embryons F2 ont ensuite été utilisés pour dériver des lignées de rbESC et pour étudier l'effet de facteurs de croissance sur le développement de l'ICM. A la fin de mon stage, j'ai également mis en reproduction les trois mâles F1 transgéniques encore vivants à savoir les mâles 249 et 296 pour la lignée 372b et le mâle 221 pour la lignée 373.3 afin d'obtenir des lapereaux F2 et d'assurer le maintien des deux lignées transgéniques. Notons que dans ce but, le sperme des mâles mosaïques F0 et des mâles hétérozygotes F1 ont également été congelés et mis dans la Cryobanque Nationale Lapin par Thierry Joly et la société HyPharm. De même une série d'embryons issus des mâles et femelles mosaïques F0 et des femelles F1 hétérozygotes a été congelée et mise en cryobanque.

J'ai réalisé cinq croisements par lignée transgénique et obtenu au total 40 lapereaux que j'ai sexés et génotypés par PCR sur l'ADN génomique extrait de biopsies d'oreille (figures 17 et 18). Pour la lignée 372.b, le mâle 249 a été croisé avec 3 femelles (49A, 49B et 49C) et le mâle 296 avec 2 femelles (96A et 96B) et ont produit au total 28 lapereaux dont 9 transgéniques (4 mâles et 5 femelles). Pour la lignée 373.3, le mâle 221 a été croisé avec 5 femelles (21A, 21B, 21C, 21D et 21E) et a produit seulement 12 lapereaux dont 8 transgéniques (6 mâles et 2 femelles) (Tableau VI). Les lapereaux F2 transgéniques ont été élevés jusqu'à leur maturité sexuelle afin de les utiliser en reproduction et de produire notamment des embryons homozygotes pour le transgène.

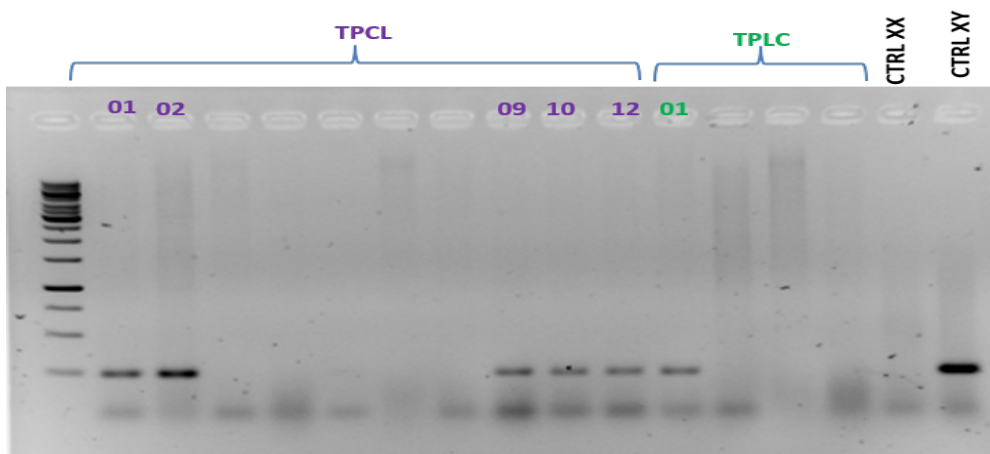


Figure 17 : Sexage des lignées de lapins F2. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1% des réactions PCR spécifiques du gène *SRY* localisé sur le chromosome Y. Marqueur de taille : Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder. Détection d'un amplicon de 250 bp pour les échantillons de sexe masculin (TPCL-01, -02, -09, -10, -12 et TPLC-01)

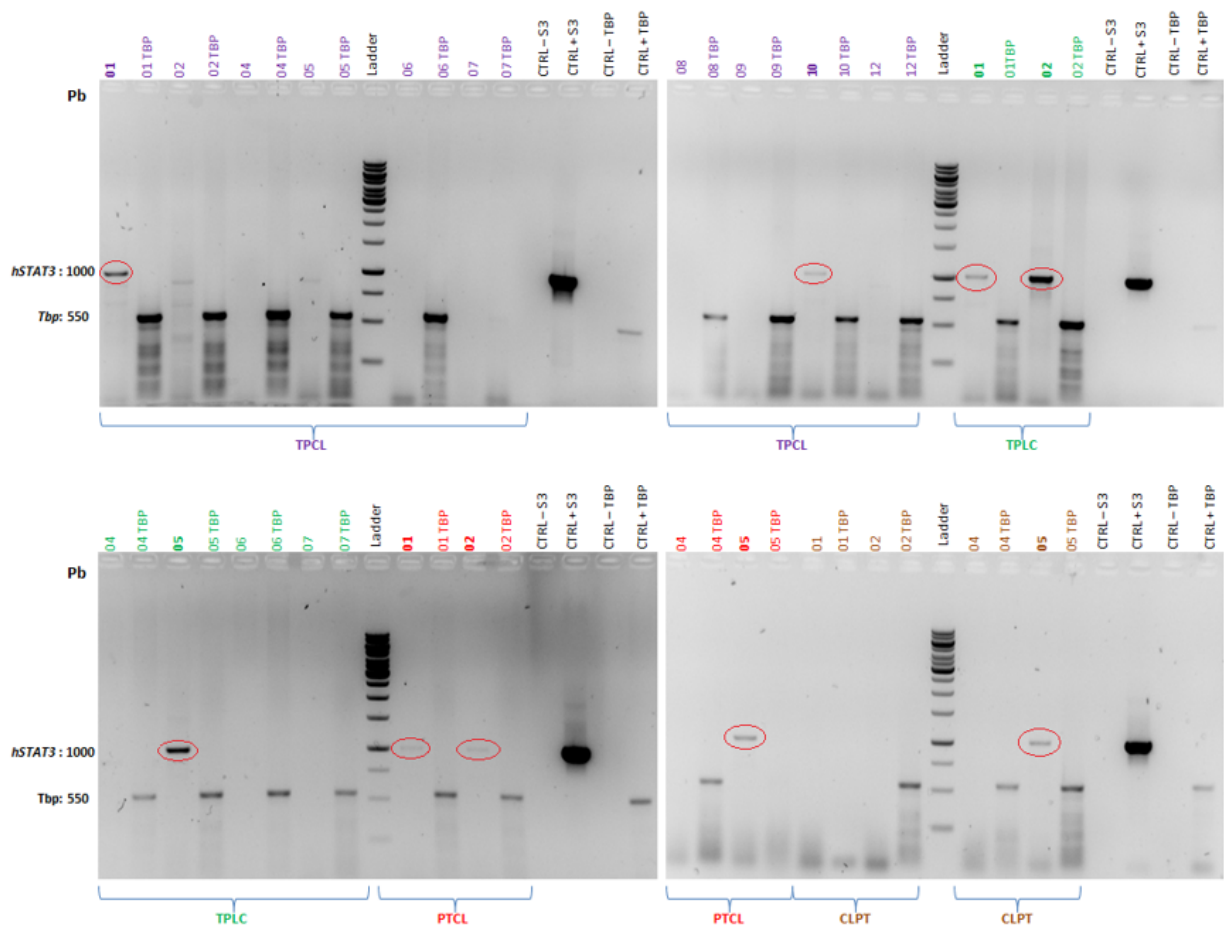


Figure 18 : Génotypage des lapereaux F2. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1% des réactions PCR spécifiques du transgène *hSTAT3-ER^{T2}* (amplicon de 1000 pb) et de l'endogène *Tbp* (amplicon de 550 pb). Marqueur de taille : Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder. Les bandes entourées en rouge correspondent les lapereaux positifs pour le transgène *hSTAT3-ER^{T2}*.

Tableau VI : Tableau récapitulatif des croisements réalisés pour produire la génération F2.

| Vecteur | Parent F0 Mosaïque | Mâle F1 Transgénique | Femelle sauvage | Nombre Lapereaux | Sexe Lapereaux | Génotype lapereaux | Numéro Lapereaux |
|---------|--------------------|----------------------|-----------------|------------------|----------------|--------------------|--|
| 372b | Mâle 4 | 249 | 49A | 6 | M | S3+ | 326 |
| | | | | 4 | F | S3- | L02-449-L09-278-L12 235-277-444-L08 |
| | | | 49B | 0 | | | |
| | | | 49C | 3 | M | S3+ | 240 |
| | | 5 | | F | S3+ | 424-268 450 | |
| | | 296 | 96A | 1 | M | S3+ | L01 |
| | | | | 3 | F | S3+ | 312-CL02 CL04 |
| | | | 96B | 2 | M | S3+ | 321 |
| | | | | 4 | F | S3+ | 317-325 316-376 |
| | | 373.3 | Mâle 128 | 221 | 21A | 3 | M |
| 1 | F | | | | | S3- | 305 |
| 21B | 1 | | | | M | S3- | P01 |
| 21C | 0 | | | | | | |
| 21D | 3 | | | | M | S3+ | 943-176-197 |
| | 4 | | | | F | S3+ | 365-810 765-942 |
| 21E | 0 | | | | | | |

V.2. Etude des lignées de rbESC

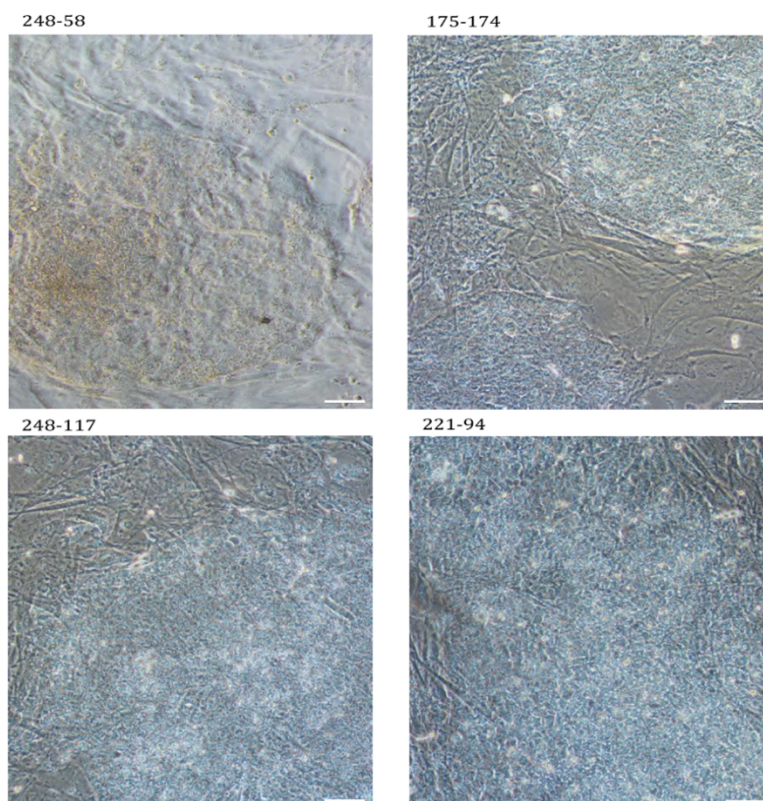
V.2.1. Obtention des lignées

La mise en culture dans le milieu US + LIF + TAX de 174 ICM d'embryons F2 issus des croisements des 4 mâles transgéniques hétérozygotes avec des femelles sauvages ont permis d'obtenir 78 excroissances P0, qui après repiquage, ont donné 48 lignées que j'ai congelées à P6, soit au bout de 25 à 29 jours de culture : 18/36 pour le mâle 180, 7/40 pour le mâle 248, 11/44 pour le mâle 175, et 12/54 pour le mâle 221) (Tableau VII). A ce stade, les lignées de rbESC sont encore en cours de dérivation et sont donc très hétérogènes avec beaucoup de cellules en différenciation (figure 19). La présence et l'expression du transgène a été analysée par immunofluorescence anti-V5 et les résultats seront présentés plus loin.

Tableau VII : Tableau récapitulatif de la dérivation des lignées de rbESC à partir d'embryons F2 (Expérience 1)

| Vecteur | Mâle F1 | ICM F2 à P0 en W4 | Clones à P1 en W4 | Lignées à P3 en W6 | Lignées P6 congelées | % lignées dérivées à P6 | Lignées Stat3+ en IF-V5 à P5 | % lignées trgs |
|---------|---------|-------------------|-------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|------------------------------|----------------|
| 372.b | 180 | 36 | 18 | 18 | 18 | 50% | 7 | 39% |
| | 248 | 40 | 20 | 10 | 7 | 18% | 4 | 57% |
| 373.3 | 175 | 44 | 17 | 16 | 11 | 25% | 10 | 91% |
| | 221 | 54 | 23 | 18 | 12 | 22% | 9 | 75% |

P : Passage ; W : nombre de puits des plaques de culture ; IF-V5+ : Lignées cultivées en présence de Tax et positives en immunofluorescence anti-V5 à P5 ; trgs : transgéniques



**Figure 19 : Exemple de la morphologie hétérogène des lignées de rbESC à P5 : lignées 248-58, 248-117, 175-174 et 221-94.
Barre d'échelle = 30 μm**

Les 48 lignées ont ensuite été décongelées et cultivées plus longtemps afin de les stabiliser à P10-P12. Seulement 16 lignées ont pu être maintenues en culture sans se différencier : 7/18 pour le mâle 180 (17%), 3/7 pour le mâle 248 (43%), 3/11 lignées pour le mâle 175 (27%) et 2/12 pour le mâle 221 (17%). Ces 16 lignées ont été étudiées de façon approfondie afin de vérifier leur état de pluripotence et donc l'effet du transgène hSTAT3-ER^{T2} sur cet état.

La morphologie de ces 16 lignées était identique pour les lignées transgéniques ou non-transgéniques et correspondait à celle des cellules rbESC dérivées précédemment en milieu US + LIF dans notre laboratoire et qui possèdent un état de pluripotence amorcé même en présence de LIF (Osteil *et al.*, 2016). J'ai donc testé différents autres milieux favorisant normalement la dérivation de cellules pluripotentes à l'état naïf chez la souris (Tableau VIII), sans pour autant obtenir de meilleurs résultats. En effet, la base du milieu de culture semble avoir beaucoup d'importance et il apparaît dans l'expérience n°2 que la base DMEM/F12 soit la mieux adaptée, même si le nombre d'embryons utilisés dans cette expérience était très faible. De plus, la matrice utilisée apparaît aussi primordiale puisque dans l'expérience n°3, très peu d'ICM ont adhéré et se sont développés sur le matrigel (une matrice synthétique), quel que soit le milieu utilisé (figure 20). Enfin, les 5 lignées obtenues dans le milieu classiquement employé pour les ESC murines (FBS/LIF) ne présentaient pas une morphologie de cellules à l'état naïf, mais toujours la morphologie observée pour les rbESC à l'état amorcé.

Tableau VIII : Test de différents milieux pour la dérivation de lignées de rbESC à partir d'embryons F2
Comparaison des expériences 1 à 3

| Expérience | Milieu | Matrice | ICM P0 | Excroissance | Lignées à P6 | % Lignées obtenues |
|------------|---------------------------------------|----------------------|--------|--------------|--------------|--------------------|
| 1 | USLT (base DMEM/F12) | MEF mmc [#] | 176 | 78 | 48 | 27% |
| 2 | USLT (base KO-DMEM) | MEF mmc | 8 | 8 | 0 | 0% |
| | USLT (base G-MEM) | MEF mmc | 8 | 8 | 1 | 12% |
| 3 | Milieu mESC (FBS/LIF/TAX)* | MEF mmc | 103 | 53 | 5 | 5% |
| | | Matrigel | 52 | 34 | 0 | 0% |
| | Milieu mESC (2i/LIF/TAX) ^o | MEF mmc | 57 | 24 | 0 | 0% |
| | | Matrigel | 40 | 6 | 0 | 0% |

[#] Cellules nourricières ; * DMEM/F12 + 10% FBS + LIF + TAX

^o 1/2 DMEM/F12 + 1/2 N2B27 + LIF + TAX + MEKi (PD0325901 à 1 µM) + GSK3βi (CHIR99021 à 3 µM)

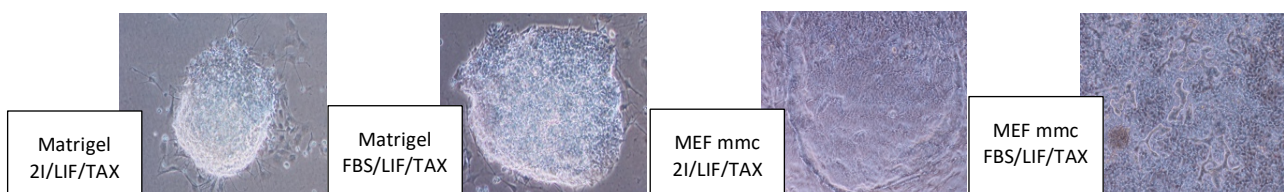


Figure 20 : Morphologie des ICM et excroissances P0 en milieu et matrice spécifiques des mESC. Expérience 3

J'ai enfin vérifié les données obtenues avec les 16 lignées de la première expérience, en répétant les dérivations dans le milieu US mais en présence ou en absence de LIF et/ou de tamoxifène (Tableau IX, expérience n°4). Le nombre de lignées obtenues à P6 en présence de LIF (21/72 = 29%) ou en présence de tamoxifène (25/72 = 35%) n'est pas apparu différent. De même, la présence de tamoxifène n'a pas semblé favoriser la dérivation des lignées transgéniques : 9 lignées transgéniques sur 25 en milieu +TAX (36%) et 10/ 21 en milieu -TAX (48%). Enfin, la présence de LIF et de tamoxifène (11/52 = 21%) n'a pas permis d'obtenir plus de lignées que leur absence (11/55 = 20%). Ces lignées ont été caractérisées et comparées aux premières lignées pour mieux analyser leur état de pluripotence.

Tableau IX : Effet du LIF et TAX sur la dérivation de lignées de rbESC à partir d'embryons F2 (Expérience 4)

| Milieu US | ICM P0 | Excroissance P0 | Lignées à P6 | % Lignées à P6 | Génotype positif | % Lignées trgs |
|------------------|--------|-----------------|--------------|----------------|------------------|----------------|
| +LIF/+TAX (USLT) | 52 | 40 | 11 | 21% | 4 | 36% |
| +LIF/-TAX (USL) | 20 | 19 | 10 | 50% | 7 | 70% |
| -LIF/+TAX (UST) | 20 | 19 | 14 | 73% | 5 | 35% |
| -LIF/-TAX (US) | 55 | 27 | 11 | 20% | 3 | 27% |

P : Passage ; trgs : transgéniques

V.2.2. Expression des transgènes

L'expression des transgènes *hSTAT3-ER^{T2}* et *ER^{T2}-hSTAT3-ER^{T2}* des 48 lignées de la première expérience et des 19 lignées transgéniques de la quatrième expérience a été étudiée à P5 par immunomarquages anti-V5 en parallèle de marquages anti-Stat3 et anti-Oct4 (figure 21). Le marquage anti-Oct4 qui révèle les cellules pluripotentes n'a concerné qu'une partie des cellules et n'a pas marqué les cellules nourricières, ni les cellules différenciées issues des embryons. Il a donc confirmé l'hétérogénéité des cellules rbESC en cours de dérivation, déjà remarqué avec les variations de morphologie des colonies. Comme attendu, le marquage des cellules avec l'anticorps anti-Stat3 était bien homogène avec une expression de la protéine dans les cytoplasmes et les noyaux de toutes les cellules, rbESC pluripotentes, rbESC différenciées et cellules nourricières. En revanche l'anticorps anti-V5 a montré un marquage uniquement des noyaux des cellules issues des embryons transgéniques et donc l'activation de la protéine humaine par le tamoxifène. De façon inattendue, beaucoup de lignées de rbESC maintenues jusqu'au P5, ont présenté un marquage anti-V5. Cela suggérait que les conditions de culture utilisées en présence de LIF et de tamoxifène favorisent la dérivation des cellules embryonnaires exprimant le transgène ou défavorisent la croissance des cellules ne le surexprimant pas. Cependant, il est apparu nécessaire de réaliser des tests de génotypage pour confirmer la présence du transgène, sachant que son expression est très faible dans les embryons issus des mâles F1 180 et 175.

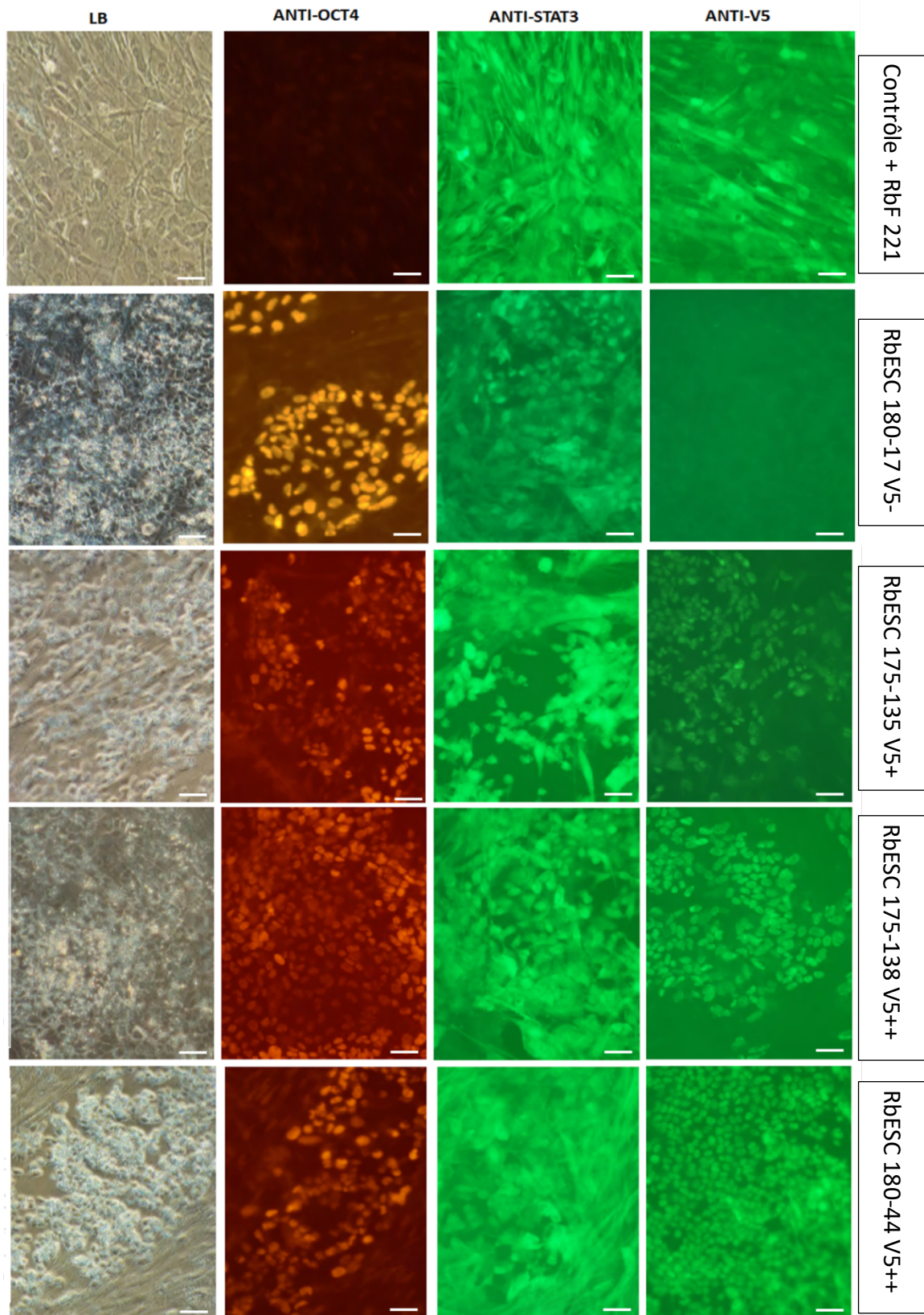


Figure 21 : Immunocytochimie indirecte sur les rbESC issues de lapins transgéniques à P5 avec les anticorps anti-Oct4, anti-Stat3 et anti-V5 et en témoin positif des RbF issus du mâle F1 221. Intensité du signal : - Négatif ; + faible ; ++ fort. Barre d'échelle : 30 µm

V.2.3. Génotypage et sexage des lignées

La présence des transgènes des 16 lignées maintenues indifférenciées après décongélation et culture pendant au moins 10 passages de la première expérience et des 46 lignées de la quatrième expérience a été confirmée par génotypage avec des amorces ne pouvant reconnaître que le transgène et non l'endogène *rbStat3*. Contre toute attente, seules 4 lignées sur les 16 obtenues dans la première expérience se sont avérées positives pour le transgène humain : les lignées 180-25, 248-58, 221-94 et 221-84 (figure 22). Par contre la présence du transgène a été détectée dans 19 lignées sur les 46 lignées obtenues à P6 dans la quatrième expérience (Tableau IX et X). J'ai observé une corrélation incomplète entre les résultats d'immuno-marquage anti-V5 et les résultats du génotypage qui peut être dû soit à une absence d'expression du transgène selon son site d'insertion, soit à des erreurs de manipulation ou d'interprétation de l'intensité des marquages anti-V5 (Tableau X, lignées notées en vert). J'ai également réalisé le sexage des 16 lignées de la première expérience avec des amorces spécifiques du gène masculin *SRY* (figure 23 ; Tableau X).

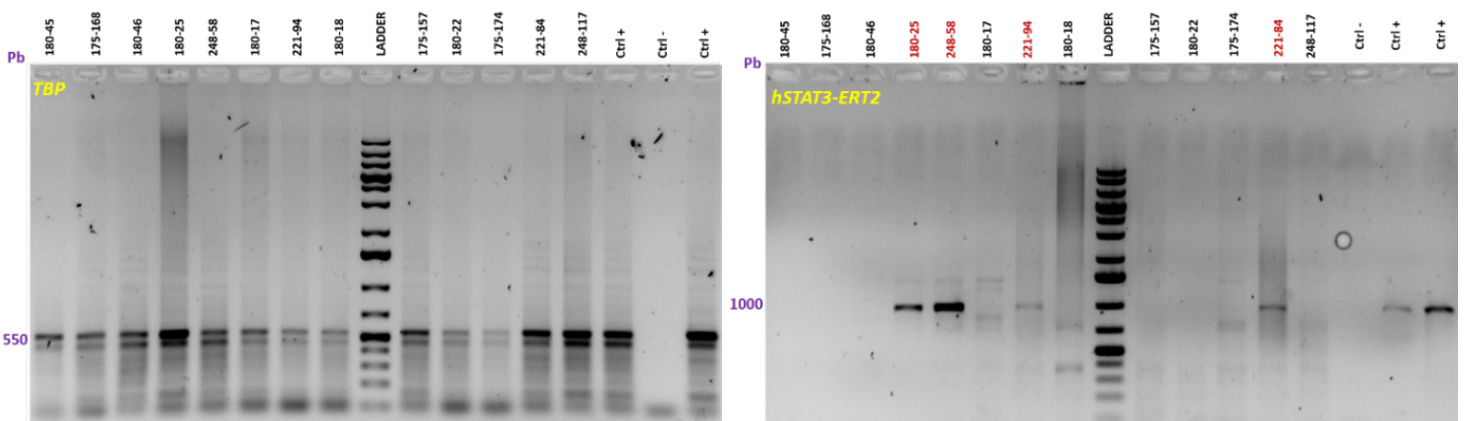


Figure 22 : Génotypage des lignées de RbESC de la première expérience avec amplification de l'endogène *Tbp* et du transgène *hSTAT3-ERT2*. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Marqueur de taille : Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder. Les numéros des lignées positifs pour le transgène sont présentés en rouge. Pb : paire de base. Ctrl : contrôle.

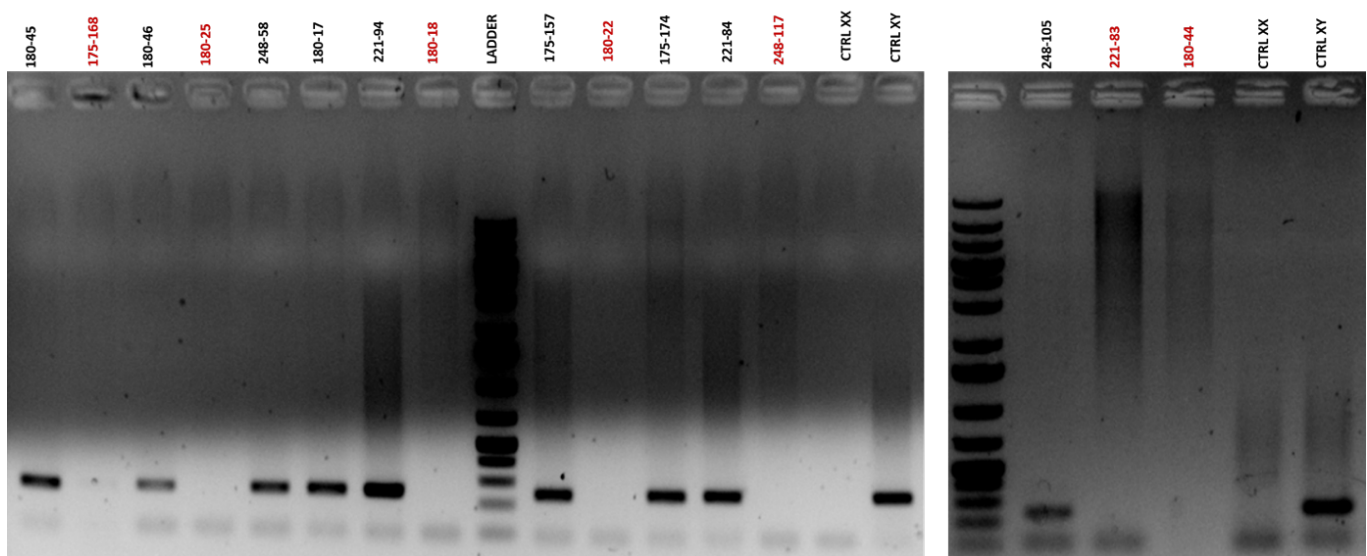


Figure 23 : Sexage des lignées de RbESC de la première expérience par amplification PCR du gène *SRY*. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Marqueur de taille : Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder. Les lignées femelles sont notées en rouge et les lignées mâles en noir.

Tableau X : Tableau récapitulatif de la caractérisation des lignées de rbESC obtenues en milieu US.

| Exp. | Milieu | Vecteur (mâle F1) | Lignées | IF anti-V5* | Génotypage ^o | Sexage |
|------|--------|-------------------|---|-----------------|---------------------------|--------|
| N°1 | USLT | 372b (180) | 180-25 | V5+ | hSTAT3-ER ^{T2} + | F |
| | | | 180-18 ; 180-44 | V5- ; V5++ | hSTAT3-ER ^{T2} - | F |
| | | | 180-17 ; 180-45 ; 180-46 | V5- ; V5- ; V5- | hSTAT3-ER ^{T2} - | M |
| | | 372b (248) | 248-58 | V5+ | hSTAT3-ER ^{T2} + | M |
| | | | 248-105 | V5++ | hSTAT3-ER ^{T2} - | M |
| | | | 248-117 | V5+ | hSTAT3-ER ^{T2} - | F |
| | | 373.3 (175) | 175-157 ; 175-174 | V5+ ; V5- | hSTAT3-ER ^{T2} - | M |
| | | | 175-168 | V5++ | hSTAT3-ER ^{T2} - | F |
| | | 373.3 (221) | 221-84 ; 221-94 | V5+ ; V5+ | hSTAT3-ER ^{T2} + | M |
| | | | 221-83 | V5- | hSTAT3-ER ^{T2} - | F |
| N°4 | USLT | 372b (248) | 248-100 ; 248-114 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} + | ND |
| | | | 248-97 ; 248-115 ; 248-117 ; 248-120 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} - | ND |
| | | 373.3 (221) | 221-49 ; 221-52 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} + | ND |
| | | | 221-47 ; 221-50 ; 221-55 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} - | ND |
| | USL | 372b (248) | 248-77 ; 248-82 ; 248-83 ; 248-84 ; 248-85 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} + | ND |
| | | | 248-78 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} - | ND |
| | | 373.3 (221) | 221-86 ; 221-91 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} + | ND |
| | | | 221-87 ; 221-88 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} - | ND |
| | UST | 372b (248) | 248-57 ; 248-60 ; 248-61 ; 248-62 ; 248-63 ; 248-64 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} - | ND |
| | | | 221-66 ; 221-67 ; 221-70 ; 221-72 ; 221-73 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} + | ND |
| | | 373.3 (221) | 221-68 ; 221-74 ; 221-75 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} - | ND |
| | | | 221-19 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} - | ND |
| | US | 372b (248) | 248-139 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} + | ND |
| | | | 248-105 ; 248-108 ; 248-120 ; 248-121 ; 248-125 ; 248-131 ; 248-139 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} - | ND |
| | | 373.3 (221) | 221-9 ; 221-23 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} + | ND |
| | | | 221-19 | ND | hSTAT3-ER ^{T2} - | ND |

* Intensité des immuno-marquages anti-V5 : V5- = Négatif ; V5+ = Faible ; V5++ = Fort

^o Lignées transgéniques (hSTAT3-ER^{T2}+) et non transgéniques (hSTAT3-ER^{T2}-); ND = Non déterminé
Les lignées notées en vert ont une discordance entre les IF anti-V5 et le génotypage.

V.2.4. Différenciation des lignées

Afin d'évaluer l'effet du LIF et du tamoxifène, et par conséquent le rôle de l'endogène *Stat3* et du transgène *hSTAT3-ER^{T2}*, sur le maintien de l'état de pluripotence des lignées de rbESC, j'ai réalisé un test de différenciation. Pour cela, les cellules ont été cultivées dans le milieu US sur matrigel ou sur cellules nourricières sous 4 conditions différentes : -TAX-LIF (US), -TAX+LIF (USL), +TAX-LIF (UST) et +TAX+LIF (USLT). Ce test a été réalisé sur 6 lignées de la première expérience, 3 transgéniques (248-58, 221-94 et 221-84) et 3 sauvages (180-17, 180-45, 180-46). La figure 24 montre un exemple des résultats obtenus sur deux de ces lignées (221-84 et 180-17) après 2 passages. Je n'ai constaté aucune différence de comportement entre les lignées sauvages et transgéniques : elles se différencient très

rapidement sur matrigel et maintiennent leur morphologie indifférenciée sur cellules nourricières et cela quelle que soit la composition du milieu. Ainsi le LIF et le tamoxifène ne semblent pas améliorer l'état de pluripotence des lignées de rbESC. Ce résultat a été confirmé par la quatrième expérience de dérivation qui a montré la possibilité de dériver des rbESC transgéniques et sauvages dans les 4 milieux différents (Tableau IX). De plus l'ensemencement de ces dernières lignées sur matrigel ou cellules nourricières dans le milieu US donnent les mêmes résultats quelle que soit la composition du milieu utilisé pour leur dérivation (figure 25).

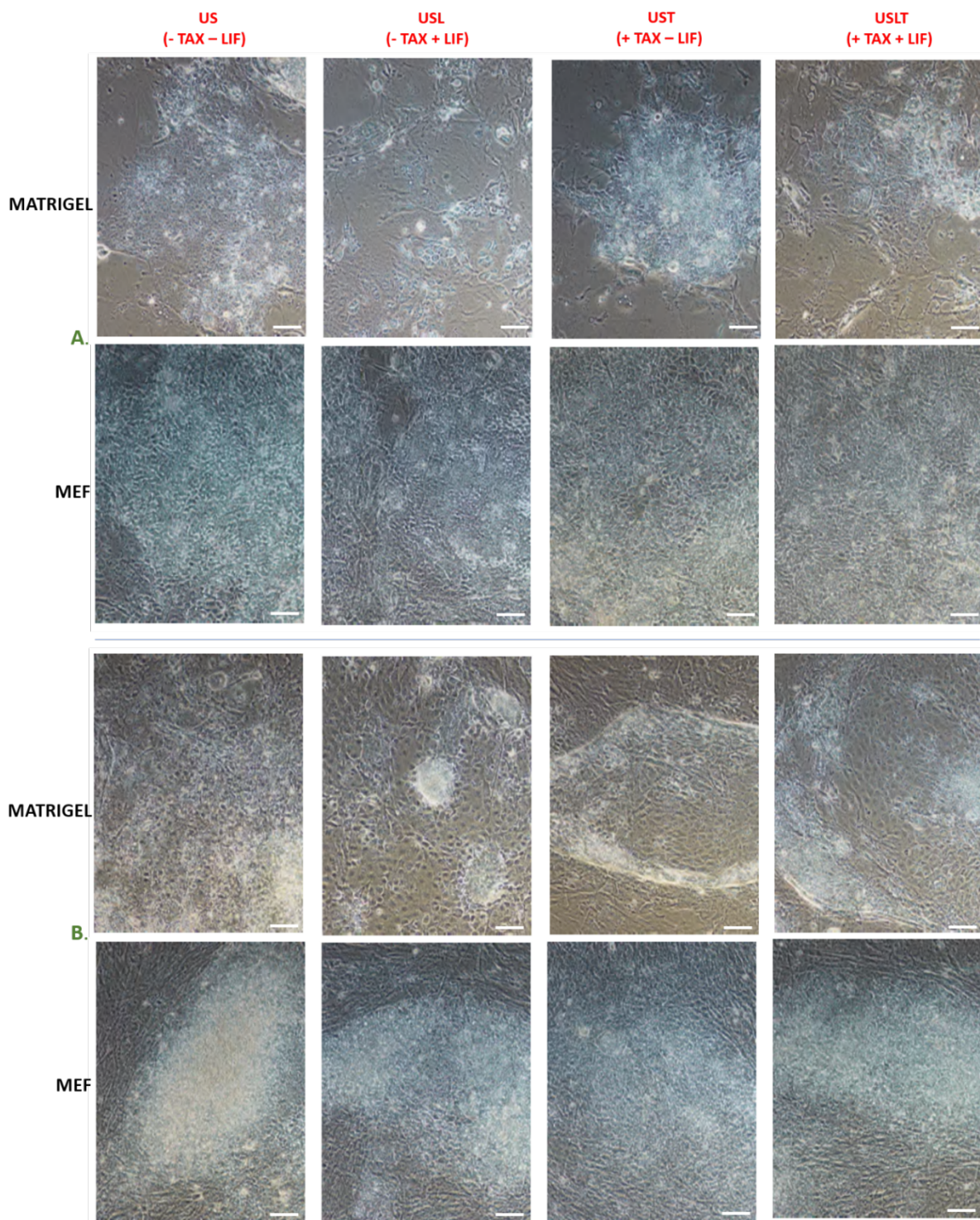


Figure 24 : Morphologie à P2 des RbESC de la première expérience lors du test de différenciation : culture en milieu US sur matrigel ou cellules nourricières (MEF mmc) en présence ou absence de LIF et de TAX ; (A) lignée transgénique 221-84. (B) lignée sauvage 180-17. Barre d'échelle : 30µm.

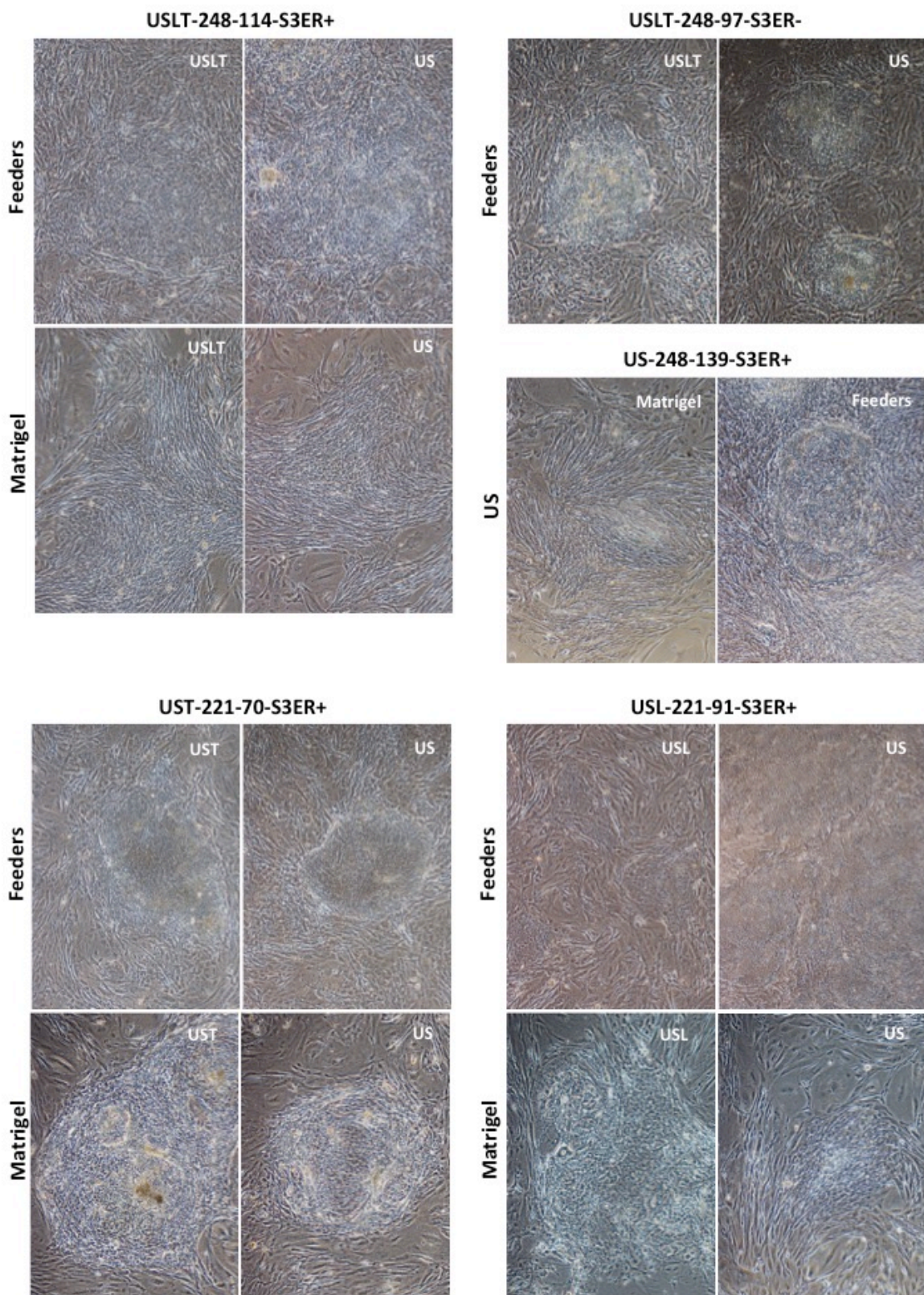


Figure 25 : Culture en milieu US sur matrigel ou cellules nourricières (MEF mmc) en comparaison de leur milieu de dérivation respectif. Le milieu de dérivation et le génotype de chaque lignée est noté en haut des différents groupes de photo. Barre d'échelle $\text{—} = 30\mu\text{m}$.

V.2.5. Expression des gènes de pluripotence

Afin de confirmer l'absence apparente d'effet de l'activation du transgène sur la pluripotence des rbESC, j'ai comparé l'expression de gènes impliqués dans la pluripotence de 8 des lignées isolées lors de la première expérience : les 4 lignées transgéniques (221-84, 221-94, 180-25 et 248-58) et 4 lignées sauvages (221-83, 175-168, 248-105 et 180-18). Onze gènes ont été analysés : l'endogène et la transgène *Stat3*, le gène de pluripotence *Oct4*, les gènes de pluripotence naïve *Klf4* et *Klf5*, 4 gènes cibles de *Stat3* (*cMyc*, *cFos*, *Socs3* et *CYP1b1*) et les gènes du récepteur du LIF (*gp130* et *LIFR*). L'expression de ces gènes a été standardisée par rapport à celle du gène de ménage *Tbp* et normalisée par rapport l'échantillon de référence constitué par les ARN d'ICM isolés à partir d'embryons E3.5 de lapin. Les variations (Fold Change) moyennes d'expression des 11 gènes des 4 lignées transgéniques et des 4 lignées sauvages sont représentées sous forme d'histogramme respectivement en bleu et en gris dans la figure 26.

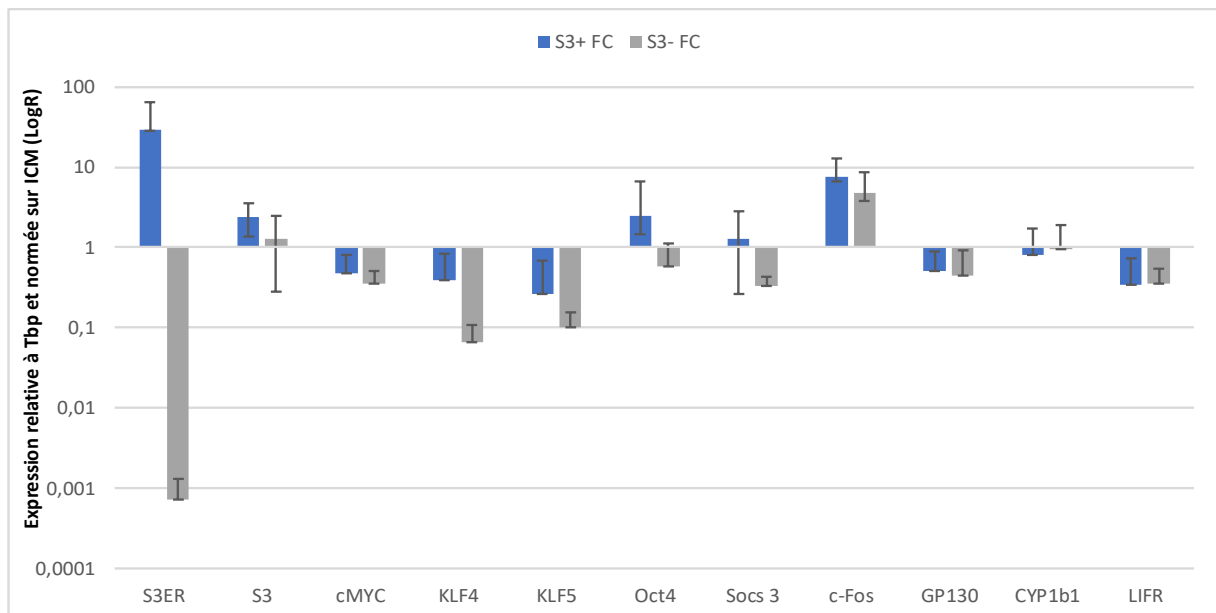


Figure 26 : Histogramme représentant les taux d'expression de 11 gènes impliqués dans la pluripotence chez 4 lignées porteuses du transgène *hSTAT3-ER^{T2}* (S3+ en bleu) et 4 lignées négatives (S3- en gris). Les taux d'expression relatifs à ceux du gène *Tbp* ont été normalisée par rapport à ceux d'un échantillon témoin (ICM). FC : fold change.

A l'exception de l'expression du transgène, les résultats montrent qu'il n'y pas de différences importantes dans l'expression des gènes étudiés entre les lignées transgéniques et sauvages. Les faibles différences observées pour les gènes *Oct4*, *c-Fos* et *Stat3* sont négligeables par rapport à la variabilité constatée entre lignées. Les gènes cibles de *Stat3* ne sont pas plus exprimés dans les lignées transgéniques que dans les lignées sauvages. De plus les gènes de pluripotence naïve, *Klf4* et *Klf5*, bien qu'un peu plus exprimés dans les lignées transgéniques que dans les lignées sauvages, n'atteignent pas le niveau d'expression des cellules de l'ICM qui représentent la référence embryonnaire de pluripotence naïve à atteindre. Ces résultats confirment donc l'absence d'effet sur l'état de pluripotence des rbESC de l'activation de l'endogène *Stat3* par le LIF et du transgène *hSTAT3-ER^{T2}* par le tamoxifène.

De la même façon, j'ai étudié l'expression des 11 gènes pour deux lignées isolées en milieu USLT dans la quatrième expérience de dérivation, lors de leur test de différenciation en milieu US sur matrigel et cellules nourricières : la lignée transgénique 248-114 (notée S3+) et la lignée sauvage 248-117 (notée S3-) (figure 27). L'histogramme montre les variations d'expression des gènes étudiés lors de la culture des cellules pendant 2 passages en milieu US ou USLT sur matrigel (notés US mat en bleu ou USLT mat en vert) et sur cellules nourricières (notés US MEF en orange ou USLT MEF en jaune). On constate d'une part qu'il y a très peu de variation d'expression des gènes pour une lignée donnée quelles que soient ses conditions de culture et d'autre part assez peu de différence d'expression pour la plupart des gènes entre la lignée transgénique et la lignée sauvage, mise à part évidemment l'expression du transgène. Seules, les expressions des gènes *Stat3*, *Oct4* et *LIFR* apparaissent différentes entre les deux lignées, mais cela peut être dû à une variabilité individuelle plus qu'à leur génotype. La différenciation plus importante des lignées sur matrigel est confirmée par la forte diminution d'expression d'*Oct4* particulièrement visible pour la lignée sauvage. Une fois de plus ces résultats montrent l'absence d'effet évident de l'activation du transgène par le tamoxifène, de même que l'inefficacité de l'ajout du LIF sur l'état de pluripotence des cellules.

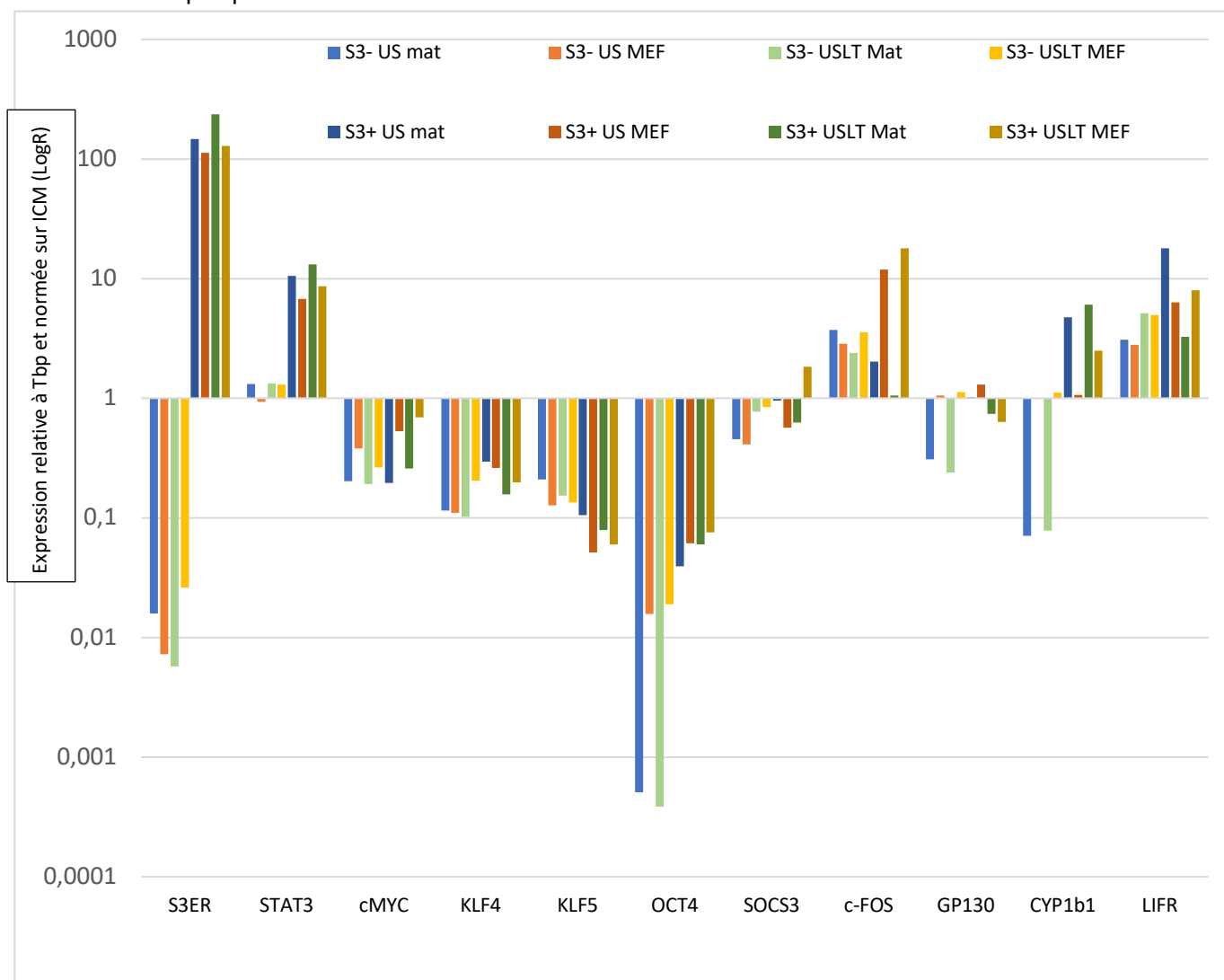


Figure 27 : Histogramme représentant les taux d'expression de 11 gènes impliqués dans la pluripotence chez la lignée transgénique 248-114 (S3+ en couleurs foncées) et la lignée sauvage 248-117 (S3- en couleurs claires), cultivées en milieu US ou USLT sur matrigel (mat) ou cellules nourricières (MEF). Les taux d'expression relatifs à ceux du gène *Tbp* ont été normalisée par rapport à ceux d'un échantillon témoin (ICM).

V.2.6. Test de colonisation

Huit lignées de rbESC isolées lors de la première expérience ont été transduites par un vecteur lentiviral exprimant la GFP et triées par cytométrie en flux afin d'obtenir des cultures de cellules exprimant la GFP de façon homogène (figure 28). Deux de ces lignées GFP-positives, l'une transgénique (221-94-GFP) et l'autre non (248-105-GFP), ont été utilisées pour tester leur capacité à coloniser un embryon hôte.

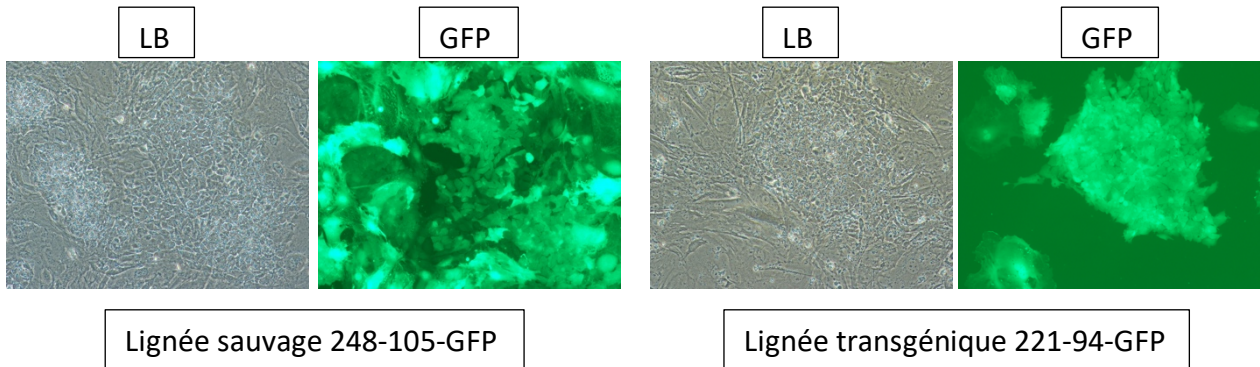


Figure 28 : Morphologie des lignées 248-105-GFP et 221-94-GFP en lumière blanche (LB) et épifluorescence verte (GFP).

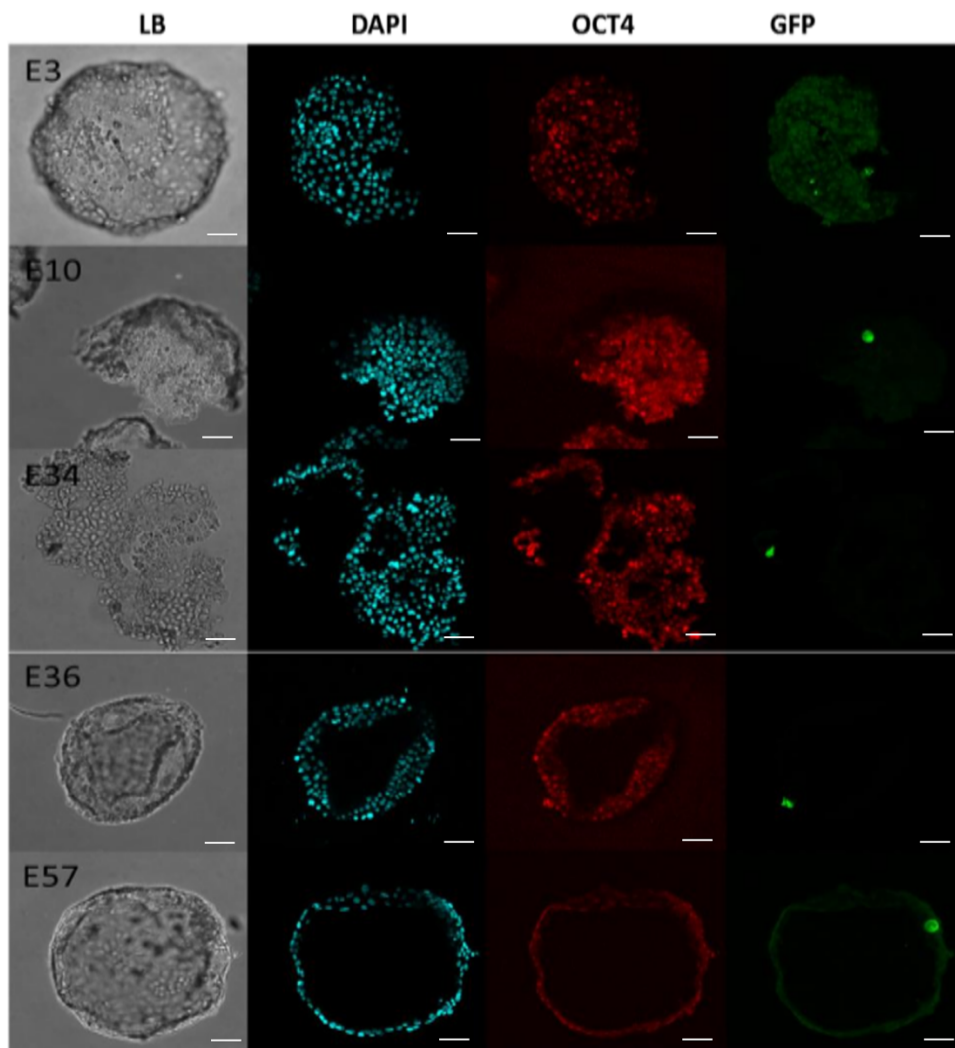


Figure 29 : Immuno-marquage anti-Oct4 et anti-GFP d'embryons de lapin micro-injectés avec des rbESC transgéniques (lignée 221-94-GFP). Marquage de l'ADN au DAPI. LB=Lumière blanche. Barre d'échelle : 100 μ m

Environ 80 embryons au stade morula ont été micro-injectés avec chacune des deux lignées, puis cultivés pendant 3 jours dans un milieu composé de 50% USLT (milieu des cellules) et 50% RDH (milieu des embryons) jusqu'au stade blastocyste tardif. Ils ont ensuite été fixés au PFA 2% et analysés par immuno-marquage avec des anticorps anti-GFP et anti-OCT4. Les résultats obtenus avec la lignée transgénique 221-94-GFP sont montrés dans la figure 29. Sur les 75 embryons micro-injectés avec des cellules transgéniques et analysés par immunofluorescence, 5 seulement (7%) ont montré la présence de quelques cellules positives pour la GFP. Ce taux de colonisation reste très faible, même si aucun des 79 embryons micro-injectés avec des cellules non transgéniques n'a montré de trace de colonisation. Il apparaît donc que la capacité des rbESC à coloniser un embryon hôte n'est pas améliorée par l'expression du transgène *hSTAT3-ER^{T2}*, ce qui est probablement corrélé avec leur état de pluripotence qui reste amorcé. Notons cependant que les caryotypes des deux lignées micro-injectées, réalisés par la société Cell Guidance Expert, se sont révélés anormaux avec la présence de quatre trisomies des chromosomes 1, 5, 16 et 18 (figure 30). On ne peut donc pas exclure que l'absence de colonisation observé ne soit pas dû à ces problèmes importants de caryotypes.

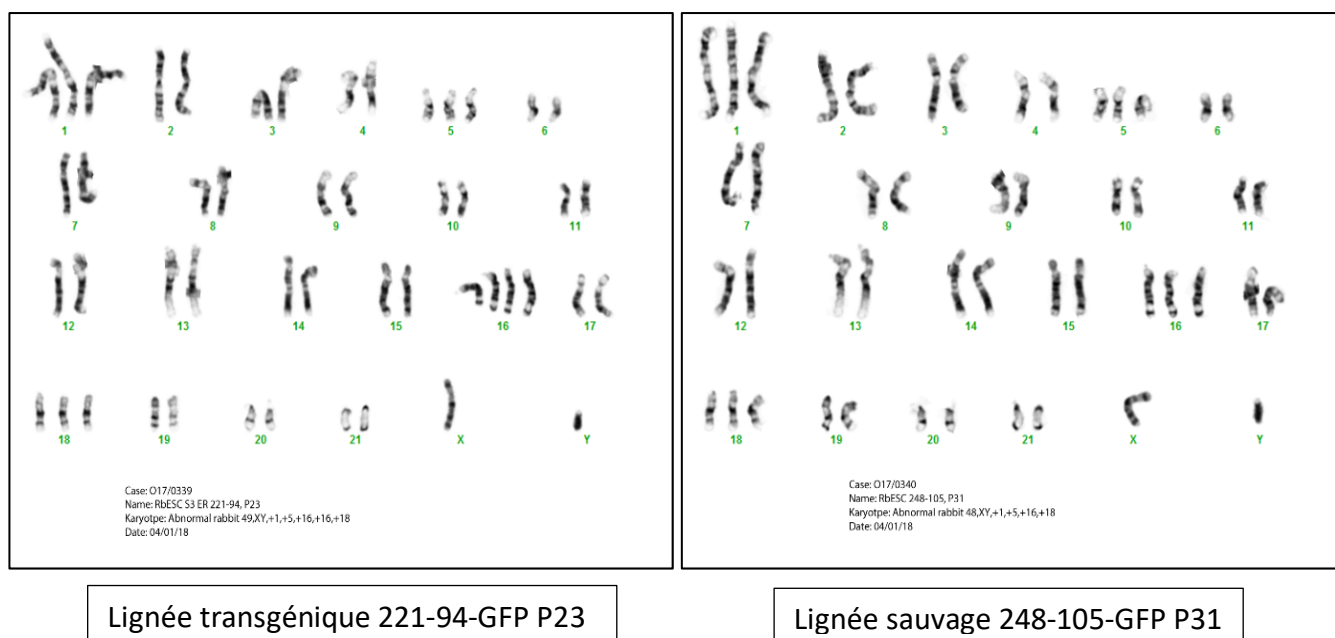


Figure 30 : Caryotypes anormaux des deux lignées micro-injectées dans des embryons hôtes (réalisés par la société Cell Guidance Expert)

V.3. Effet de facteurs de croissance sur les embryons transgéniques

Les résultats obtenus avec les lignées de rbESC issues d'embryons transgéniques étant très décevants et ne correspondant pas aux résultats attendus, nous avons décidé de tester l'effet de différentes molécules et de leur combinaison sur l'expression des gènes impliqués dans la pluripotence directement dans les embryons transgéniques et sauvages, ou sur des ICM seulement 24h après leur mise en culture. Ces expériences ont eu pour but de voir si on pouvait soutenir ou améliorer l'état de pluripotence des cellules de l'ICM dans l'embryon ou dès leur mise en culture grâce à ces molécules.

V.3.1. Effet du TGFβ et de l'activine

La voie activine/TGFβ est essentielle au maintien de la pluripotence des ESC chez les espèces non-murines. En effet, les différentes méthodes de reprogrammation des ESC humaines vers l'état naïf utilisent toujours des cellules nourricières productrices entre autres d'activine ou une addition directement d'activine dans le milieu. De plus, l'ajout d'activine et de TGFβ dans le milieu de culture d'embryons humains semblent faciliter la dérivation de hESC présentant un état de pluripotence plus proche de l'état naïf (Rossant et Tam, 2017 ; Ramos-Ibeas *et al.*, 2018). Dans ce but, des morula E2.5 issues du croisement de mâles sauvages ou des mâles transgéniques 221 ou 248 avec les femelles sauvages ont été cultivées pendant 48h en présence ou non de LIF, TAX, activine et TGFβ, puis ont été congelés individuellement afin d'étudier l'expression de gènes impliqués dans la pluripotence par qPCR. Dans un premier temps, les embryons ont été génotypés sur la base de l'expression du transgène *hSTAT3-ER^{T2}*. L'histogramme de la figure 31 montre l'expression moyenne du transgène relative à celle du gène de ménage *Tbp* et normalisée par rapport à celle de l'échantillon de référence composé d'embryons issus d'animaux sauvages cultivés en absence de molécules (WT), des différentes catégories d'embryons selon leur génotype, transgénique (S3+) ou sauvage (S3-), et leurs conditions de culture, sans molécule (-), en présence de LIF (L), de tamoxifène (T), des deux (LT) et des quatre molécules LIF, tamoxifène, activine et TGFβ ensemble (TLAB).

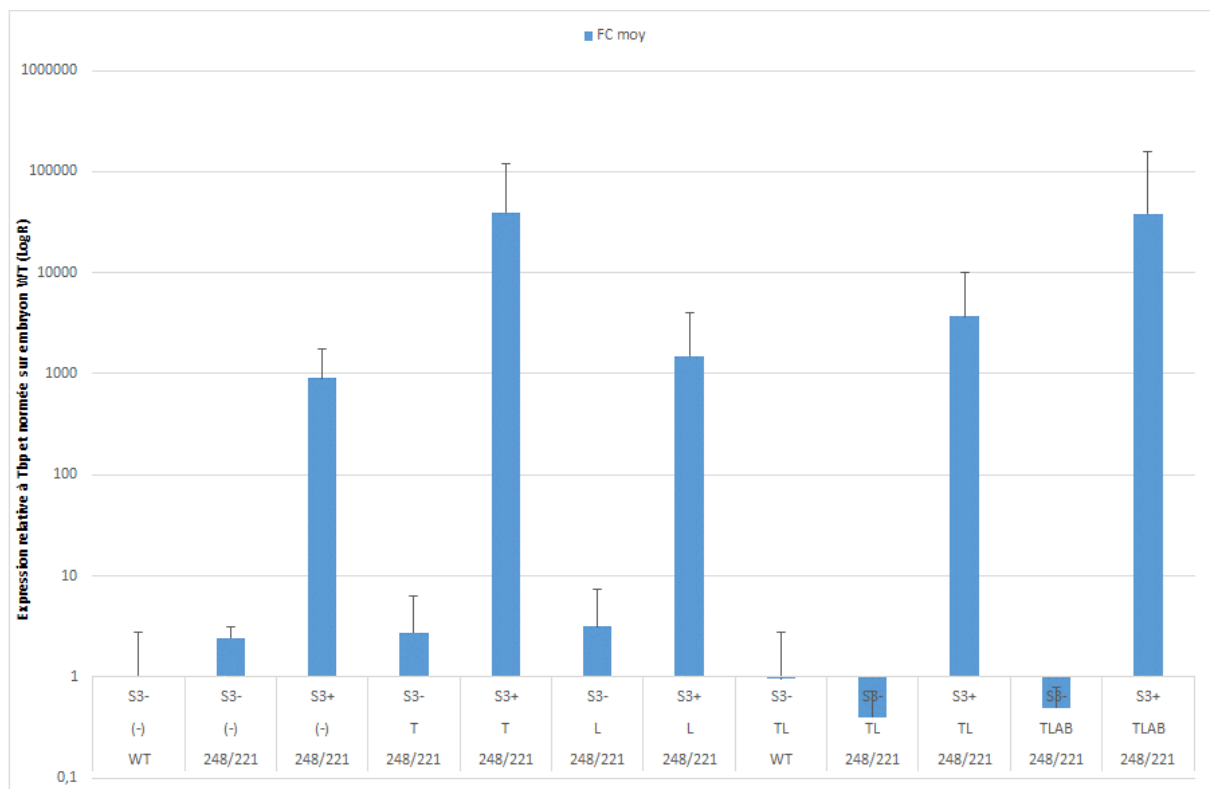


Figure 31 : Histogramme représentant le taux d'expression moyen du transgène *hSTAT3-ER^{T2}* dans les embryons sauvages témoins (WT), transgéniques (S3+) ou non transgéniques (S3-) cultivés dans quatre conditions différentes : sans molécules (-) ; en présence de tamoxifène (T) ; en présence de LIF (L) ; en présence de tamoxifène et LIF (TL) ; en présence de tamoxifène, LIF, activine et TGFβ (TLAB). L'expression du transgène est standardisée par rapport à celle du gène *Tbp* et normalisée par rapport à celle de l'échantillon d'embryons témoins. FC moy : fold change moyen.

Au total 103 embryons ont été testés : 13 embryons sauvages (WT) et 88 embryons issus des mâles transgéniques 221 ou 248. Sur les 88 embryons, 51 se sont avérés positifs pour le transgène et 37 négatifs. Ces résultats sont cohérents avec la répartition Mendélienne. L'expression de deux gènes cibles de *Stat3* (*Socs3* et *CYP1b1*) et des gènes de pluripotence naïve (*Klf4* et *Klf5*) ont été analysés uniquement dans les embryons transgéniques (S3+) cultivés sans molécule (-) ou en présence de LIF (L), de tamoxifène (T), ou des 4 molécules étudiées (TLAB) (figure 32). Du fait de problèmes techniques, les résultats concernant les embryons cultivés avec du Tamoxifène et du LIF n'ont pas pu être pris en compte dans l'analyse, de même pour les l'expression des autres gènes testés, à savoir *Stat3*, *Oct4*, *cMyc*, *cFos*, *gp130* et *LIFR*.

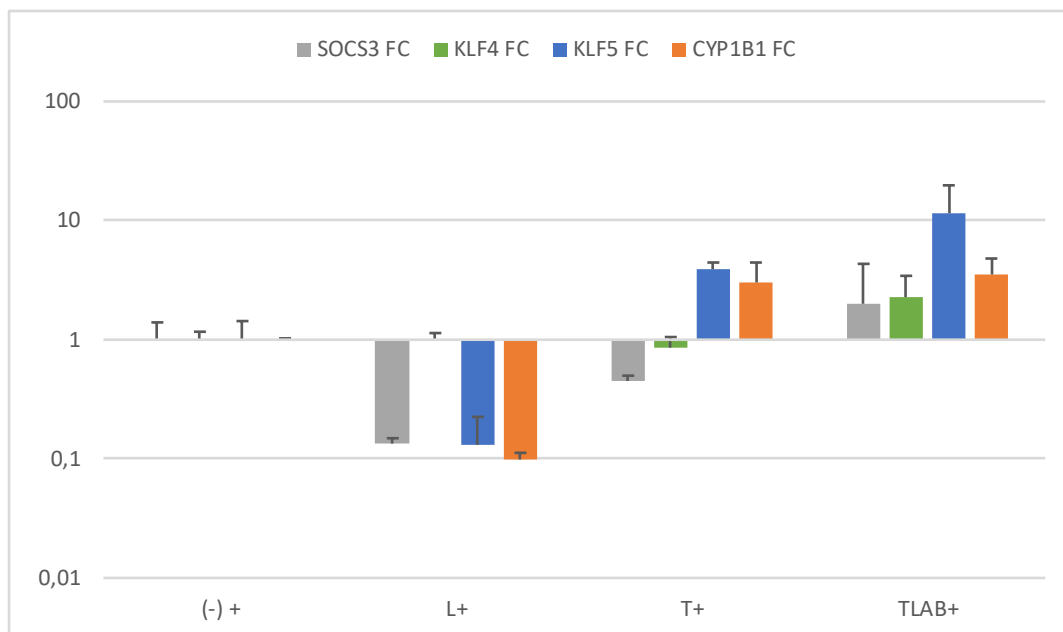


Figure 32 : Histogramme représentant le taux d'expression des gènes *Socs3*, *Klf4*, *Klf5* et *CYP1b1* dans les embryons transgéniques *hSTAT3-ER²²* cultivés dans différentes conditions : en présence de tamoxifène (T), de LIF (L), ou de tamoxifène, LIF, Activine et TGF β (TLAB). L'expression des gènes est standardisée par rapport à celle du gène *Tbp* et normalisée par rapport à celle de l'échantillon d'embryons sauvages témoins. FC : fold change.

Les résultats obtenus montrent que le LIF ne permet pas d'activer les gènes cibles de *Stat3*, ni les gènes de pluripotence naïve. Le LIF seul est donc incapable d'activer la signalisation *Stat3* endogène dans les embryons de lapin. De même, le tamoxifène seul a peu d'effet sur l'activation du transgène, vu les variations faibles de l'expression des gènes étudiés. Seule, la combinaison des 4 molécules entraîne une augmentation de l'expression des gènes étudiés et notamment de *Klf5*. Mais l'absence de condition de culture avec les combinaisons deux à deux de ces molécules ne permet pas de conclure sur le ou les molécules responsables de cet effet. On peut supposer d'après les résultats obtenus avec les dérivations de lignées de rbESC que cet effet est dû à l'activine et au TGF β , mais sans certitude. Pour confirmer cet effet, il faudrait compléter cette analyse avec un nombre plus importante d'embryons, d'autres conditions de culture et étudier l'expression d'autres gènes impliqués dans la pluripotence.

V.3.2. Effet de l'interleukine 6 et du récepteur de l'interleukine 6

L'interleukine 6 (IL6) est une cytokine de la même famille que le LIF, sa fixation sur son récepteur soluble permet la dimérisation avec gp130 et l'activation de la voie de signalisation Stat3 (Yoshida et al., 1994 & 1996). Des analyses transcriptomiques réalisées sur des blastocystes de lapin par le doctorant Wilhelm Bouchereau dans notre laboratoire, ont montré que l'ICM exprime la protéine gp130 mais pas le récepteur du LIF et que le trophoctoderme exprime l'IL6 mais pas le LIF. De ce fait, afin de vérifier si la combinaison IL6 et IL6-Récepteur pourrait activer plus efficacement la voie Stat3 endogène que le LIF, j'ai testé l'effet de ces molécules sur des ICM mis en culture pendant 24h avant d'être congelés individuellement. Ainsi les ICM de 60 embryons issus des mâles transgéniques 221 et 248, ont été mis en culture sur cellules nourricières en milieu US en présence ou non de LIF (L en bleu), de tamoxifène (T en marron), d'Interleukine 6 + IL6-Récepteur soluble (R6 en orange), ainsi que de combinaisons de ces molécules (LT en Bleu pastel, TR6 en gris et LTR6 en rouge), puis l'expression des 11 gènes impliqués dans la pluripotence étudiés précédemment a été analysée par qPCR. Parmi les 60 ICM, 34 se sont avérés être positifs (S3+, notés en couleurs foncées) pour l'expression du transgène et 26 négatifs (S3-, notés en couleurs claires). Les 4 ICM négatifs cultivés en milieu US sans additif ont servis d'échantillons de référence. Les expressions moyennes des gènes *hSTAT3-ER^{T2}*, *Stat3*, *c-Myc*, *Klf4*, *Klf5*, *Gp130*, *Cyp1b1*, *LIFR*, *Oct4*, *Socs3* et *c-Fos*, relatives à celle du gène *Tbp* et normalisées à celle des échantillons de références, sont représentés sous forme d'histogramme pour chaque groupe d'ICM (figure 33).

Comme observé précédemment, les variations d'expression géniques sont très faibles entre les différentes conditions à part pour l'expression du transgène *hSTAT3-ER^{T2}* qui permet de définir les ICM transgéniques et sauvages. Il existe une très forte variabilité d'expression entre les ICM qui rend les variations d'expression dues aux conditions de culture très difficiles à mettre en évidence. Notons que l'échantillon T(S3-) en marron clair ne contient qu'un ICM et qu'il n'est donc pas représentatif. Il apparaît cependant que la combinaison IL6/IL6R ne soit pas plus efficace que le LIF pour activer la voie Stat3 endogène. Aucune des combinaisons permettant d'activer les voies Stat3 endogènes et exogènes ne semble efficace pour augmenter l'expression des gènes cibles de Stat3 et les gènes de pluripotence naïve. Ainsi dans les ICM, comme dans les rbESC et les embryons F2 transgéniques, le LIF (ou la combinaison R6) et le tamoxifène n'ont pas d'impact important sur l'expression des gènes de pluripotence, quelle que soit la voie de signalisation impliqué, Stat3 endogène ou Stat3 exogène. Une fois de plus, il semble que l'expression du transgène ne permette pas de modifier l'état de pluripotence amorcée spontanément acquise par les cellules de l'ICM mises en culture. Par ailleurs, l'hétérogénéité inter-ICM pose la question sur l'expression uniforme ou non du transgène. Afin de réponse à cette question, j'ai réalisé un immuno-marquage anti-V5 sur 24 ICM cultivés pendant 60h sur des lamelles de verre recouvertes de cellules nourricières en présence ou non de tamoxifène (figure 34).

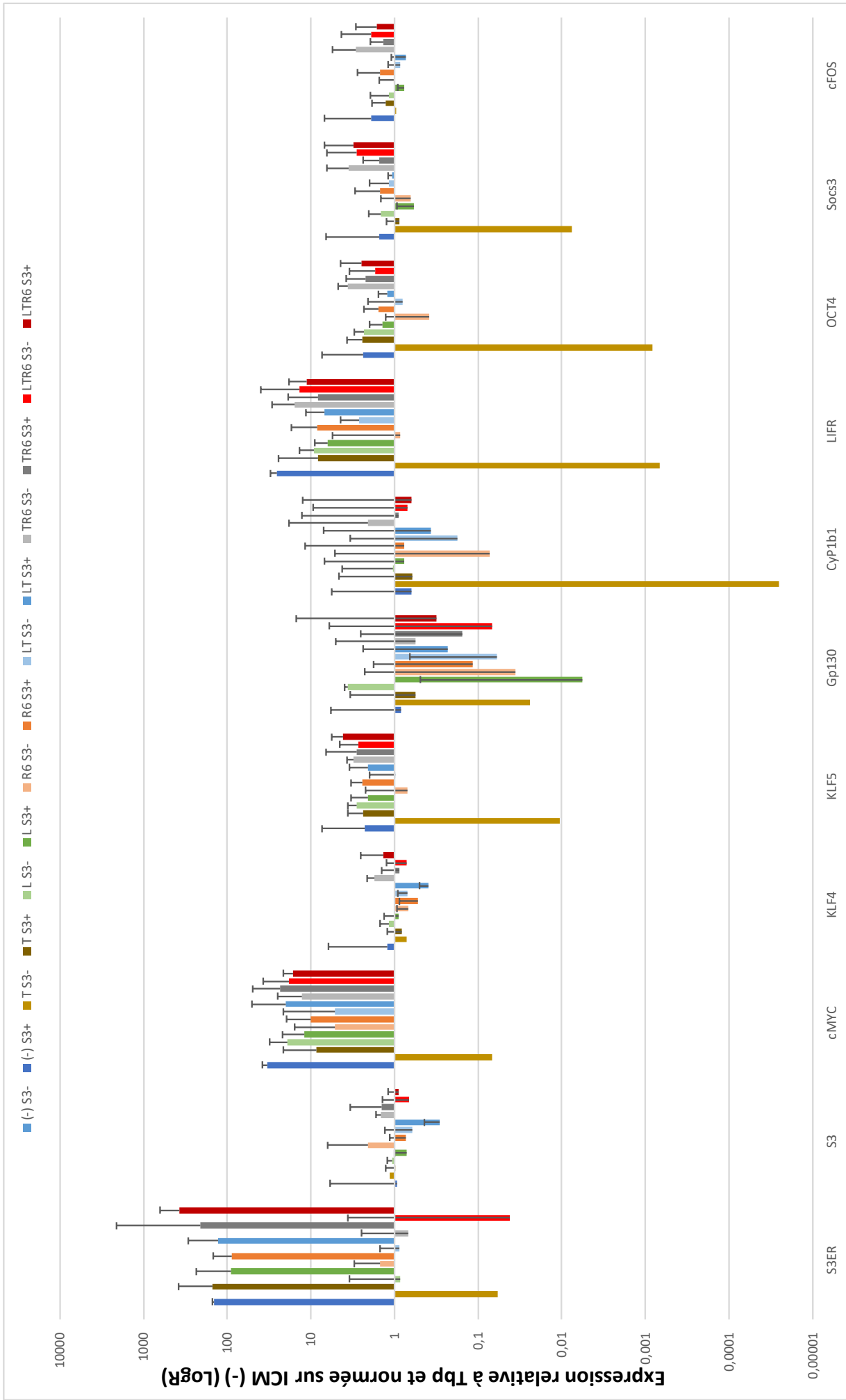


Figure 33 : Histogramme représentant le taux d'expression moyen des gènes *hSTAT3-ER^{T2}*, *Stat3*, *c-Myc*, *Klf4*, *Klf5*, *Gp130*, *Cyp1b1*, *LIFR*, *Oct4*, *Socs3* et *c-Fos* d'ICM transgéniques (S3+) ou sauvages (S3-) cultivés dans différentes conditions : en absence de facteur (-), en présence de tamoxifène (T), de LIF (L), d'IL6/IL6R (R6), de LIF + TAX (LT), de TAX + IL6/IL6R (TR6) et de LIF + TAX + IL6/IL6R (LTR6). L'expression des gènes est standardisée par rapport à celle de *Tbp* et normalisée par rapport à celle de l'échantillon de référence (ICM sauvages cultivés sans facteurs = (-) S3-).

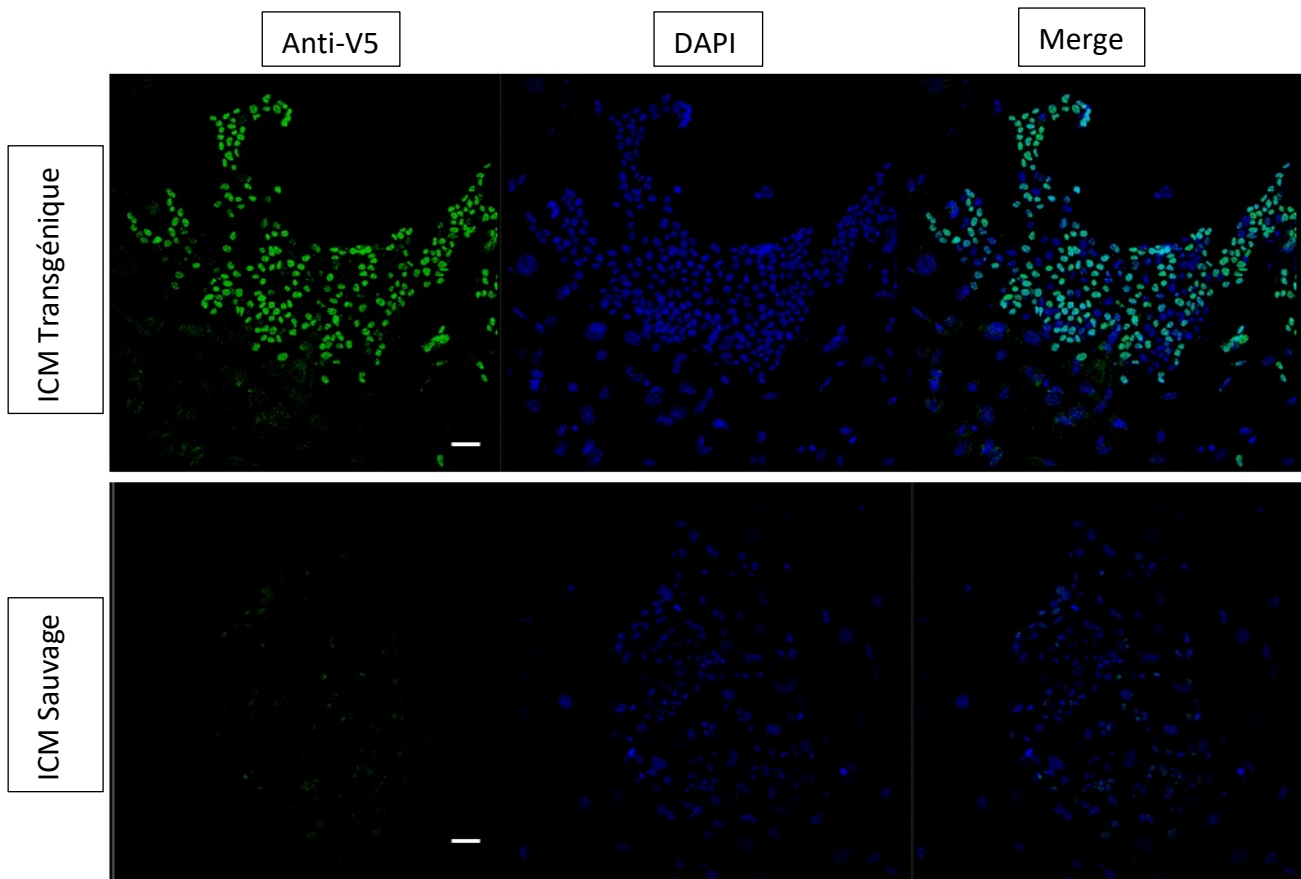


Figure 34 : Immuno-marquages anti-V5 d'ICM mis en culture pendant 24h dans un milieu US + tamoxifène et observés au microscope confocal. L'ADN est coloré en bleu par le DAPI. Barre d'échelle : 50mm.

Les marquages anti-V5 montrent que le transgène n'est pas exprimé de façon homogène par toutes les cellules d'un ICM transgénique donné, certaines cellules ne l'expriment pas du tout et d'autres de façon moins importante. Cela explique l'hétérogénéité inter-embryon observée dans les expériences précédentes. De plus, dans cette expérience certains ICM ont été cultivés sans tamoxifène afin de voir l'activation de la protéine hSTAT3 et son passage du cytoplasme au noyau. Cependant tous les embryons positifs pour le transgène ont montré un marquage nucléaire. Cela peut être dû soit au hasard, à savoir que tous les embryons transgéniques étaient ceux mis en contact avec du tamoxifène, soit à une erreur de manipulation avec un ajout de tamoxifène dans tous les embryons. Cependant il est apparu nécessaire de vérifier si cette hétérogénéité d'expression du transgène est spécifique aux embryons ou provient d'une perte du transgène lors des croisements et générations de lapin hétérozygotes. Pour cela, j'ai réalisé des cultures primaires de fibroblastes issus de biopsie d'oreille et de cellules souches mésenchymateuses (MSC) issues de biopsie de moelle osseuse de lapereaux F2 sacrifiés pour cause de malformation des pattes avant (lapins dits avion). J'ai génotypé ces lignées cellulaires et un marquage anti-V5 a été effectué par Worawalan Samruan, une doctorante de l'équipe, sur les cellules des lignées de rbF et MSC issues d'un lapereau transgénique (S3+) et d'un lapereau sauvage (S3-) (figure 35). Il apparaît ainsi que le transgène n'est pas exprimé de façon homogène dans toutes les cellules des lignées transgéniques, quel que soit le type de cellules, rbF ou MSC, mais que

l'activation de la protéine transgénique hSTAT3-ER^{T2} ne se produit bien qu'en présence de tamoxifène. En effet le marquage anti-V5 est cytoplasmique en absence de TAX et nucléaire en présence de TAX.

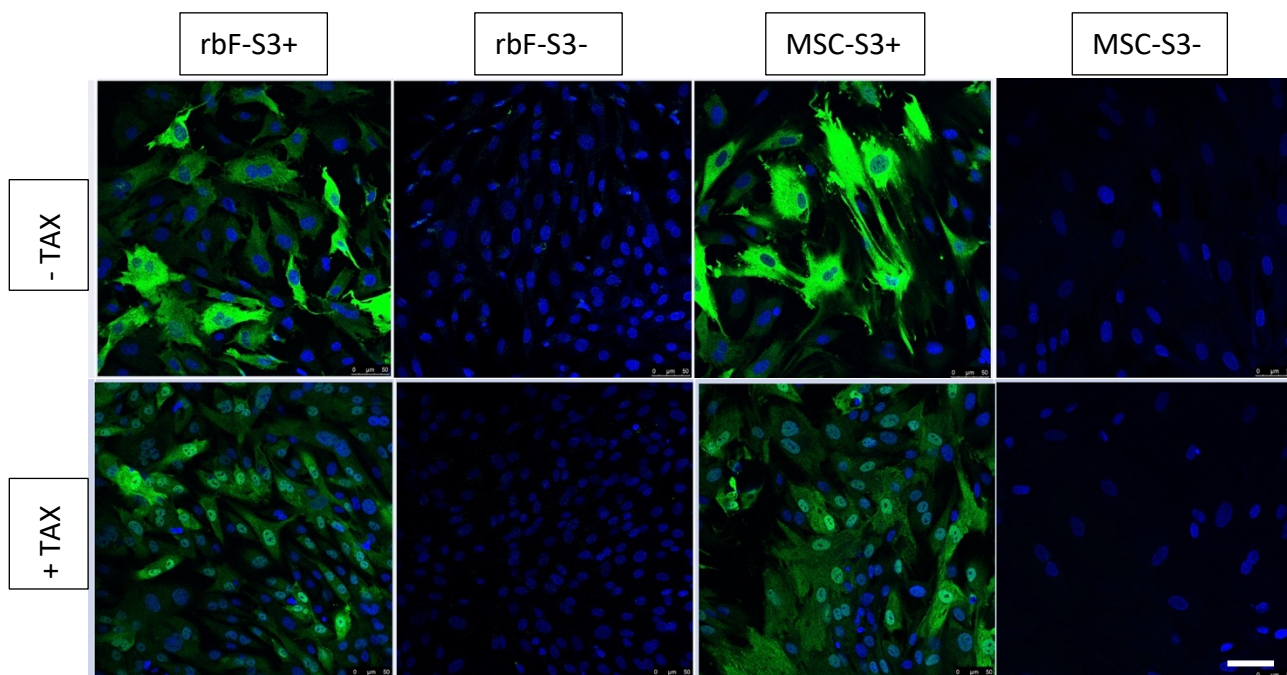


Figure 35 : Immuno-marquages anti-V5 de rbF et MSC transgéniques (S3+) et sauvages (S3-) cultivés en présence (+TAX) ou en absence (-TAX) de tamoxifène et observés au microscope confocal. L'ADN est coloré en bleu par le DAPI. Barre d'échelle : 50mm.

VI. DISCUSSION

Mon travail au sein de l'équipe « Cellules souches pluripotentes de Mammifères » dirigée par Pierre Savatier s'est inscrit dans l'objectif majeur d'obtenir des lignées de cellules souches pluripotentes de lapin présentant un état naïf de pluripotence, à savoir des rbESC ou des rbiPSC capables de former des chimères lorsqu'elles sont injectées dans un embryon hôte afin de créer des lapins transgéniques modèles de maladies humaines. Dans ce cadre, mon but était d'obtenir des rbESC dérivées à partir d'embryons issus de deux lignées de lapins transgéniques pour le gène *hSTAT3-ER^{T2}*, et d'étudier l'effet de l'activation de ce transgène sur leur état de pluripotence. J'ai donc participé à la caractérisation et au maintien des lignées de lapins transgéniques et dérivé différentes lignées de rbESC exprimant le transgène. Cependant les résultats obtenus sont décevants car l'étude de ces lignées n'a montré aucune amélioration de l'état de pluripotence des cellules qui gardent une morphologie de cellules amorcées et restent dépendantes de facteurs produits par les cellules nourricières.

VI.1. Choix du transgène

Stat3 est à la fois une molécule de signalisation et un facteur de transcription qui permet de transmettre directement le signal extracellulaire induit par la fixation du LIF sur le récepteur hétérodimérique LIFR/gp130 au réseau de gènes de pluripotence en activant ses gènes cibles après phosphorylation et transfert nucléaire (Humphrey *et al.* 2004). Stat3 a été montré comme essentiel et suffisant au maintien de l'état naïf de pluripotence chez la souris (Niwa *et al.*, 1998). En effet la surexpression d'une forme hormono-dépendante de cette protéine (Stat3-ER^{T2}) permet de maintenir les mESC à l'état indifférencié en absence de LIF. Les cellules souches pluripotentes de primate expriment tous les éléments de la voie LIF/gp130/Stat3 mais apparemment à un niveau insuffisant pour maintenir les cellules à l'état naïf (Daheron *et al.*, 2004). Cependant la coopération entre la signalisation LIF (voie Stat3 endogène) et l'activation de la protéine exogène mStat3-ER^{T2} par le tamoxifène permet de reprogrammer des hESC et hiPSC à l'état naïf (Chen *et al.*, 2015). Afin de vérifier si une même synergie entre LIF et tamoxifène pourrait promouvoir la pluripotence naïve chez le lapin, mon équipe d'accueil a produit deux lignées de lapins transgéniques exprimant la forme hormono-dépendante de la protéine humaine Stat3. La séquence humaine a été utilisée plutôt que la séquence murine, car le génome du lapin est plus proche de celui des primates que de celui de la souris (Graur *et al.*, 1996). De plus, étant donné le rôle possible de Stat3 dans de nombreux mécanismes cellulaires pouvant entraîner l'apparition de tumeur ou gêner le développement embryonnaire, deux constructions ont été utilisées afin de bloquer la protéine transgénique sous forme inactive dans le cytoplasme des cellules grâce à une (*hSTAT3-ER^{T2}*, vecteur 372b) ou deux (*ER^{T2}-hSTAT3-ER^{T2}*, vecteur 373.3) séquences ER^{T2}. Cette séquence ER^{T2} correspond à la zone de fixation du ligand du récepteur aux œstrogènes qui a été mutée pour ne fixer spécifiquement que le tamoxifène. Ainsi le transgène *hSTAT3-ER^{T2}* est exprimé de façon ubiquitaire à partir du promoteur fort CAG, mais la protéine est séquestrée dans le cytoplasme par des protéines de stress et n'est activée qu'en présence de tamoxifène, qui permet sa libération, sa dimérisation et sa translocation

dans le noyau (Metzger *et al.*, 1995). Le fait d'avoir obtenu des lapins transgéniques permet de confirmer l'absence d'effet indésirable de la protéine exogène inactivée.

VI.2. Méthode de transgénèse

La technique de micro-injection d'ADN utilisée pour produire les deux lignées de lapins transgéniques est la seule développée actuellement chez le lapin pour induire des surexpressions de gènes. En effet, même si l'utilisation des endonucléases, comme les TALEN, les ZFN et surtout les systèmes Crispr/Cas9, s'est beaucoup développée ces dernières années, y compris chez le lapin, ces techniques restent pour l'instant très efficace pour produire des délétions, mais sont encore peu employées pour produire des insertions (Yang *et al.*, 2019). Cependant la mise en évidence récente chez le lapin d'un homologue du locus murin ROSA26 exprimé de façon ubiquitaire pourrait palier aux faibles efficacités obtenus lors de la production d'insertions géniques et aux risques potentiels des insertions aléatoires (Yang *et al.*, 2016). Concernant la production des lignées de lapins transgéniques *hSTAT3-ER^{T2}*, nous avons obtenu 8 lapereaux F0 positifs pour la présence du transgène sur 164 lapereaux nés vivants (4,8%) issus de 1324 embryons micro-injectés et transférés (12,4%), soit un taux de réussite de 0,6%, ce qui correspond à l'efficacité classiquement obtenue avec cette technique (Houdebine, 2009). Comme attendu avec cette méthode, ces 8 animaux étaient mosaïques puisqu'ils n'ont pas transmis le transgène à leur descendants F1 avec la même efficacité, celle-ci variant entre 6 et 77% et étant même nulle pour deux mâles. L'efficacité de transmission est vraisemblablement corrélée à l'efficacité d'insertion du transgène lors des segmentations de l'embryon : plus les insertions se produisent rapidement après la micro-injection de l'ADN plasmidien, plus la probabilité de modifier les cellules à l'origine de la lignée germinale est forte. Il ne semble pas y avoir de corrélation entre le taux de transmission observé et le vecteur injecté ou le sexe des parents F0 mosaïques.

VI.3. Expression du transgène

Les mâles F1 hétérozygotes fondateurs des deux lignées transgéniques ont été sélectionnés sur l'expression activable de la protéine transgénique dans des fibroblastes issus de biopsie de peau d'oreille. En effet, ces mâles sont issus de croisement entre un animal F0 mosaïque et un animal sauvage, ils sont donc hétérozygotes et peuvent provenir de gamètes présentant des sites d'insertion et un nombre de copies du transgène différents. Malgré la présence dans la construction de séquences isolatrices et l'utilisation d'un promoteur fort et ubiquitaire, il est possible que l'expression du transgène varie selon son site d'insertion et son intégration en tandem ou non. Il était donc important de vérifier la présence et l'activation par le tamoxifène de la protéine humaine exogène pour choisir les mâles fondateurs des lignées. En effet, la révélation spécifique de la protéine hSTAT3 taggée par immunomarquage grâce à un anticorps anti-V5 a permis de mettre en évidence 8 mâles F1 exprimant la protéine exogène sur les 19 mâles obtenus et testés. Ces 8 mâles provenaient de 4 parents F0 différents sur les 6 transmettant le transgène, avec 2 triplets possédant un même père F0 (248, 249 et 296 issus du mâle 4 ; 221, 274 et 277 issus du mâle 128) présentant respectivement un taux de transmission de 35% et 53%. Ces résultats montrent effectivement que tous les descendants F1 d'un même individu F0 n'étaient pas issus d'une seule cellule ayant subi un évènement unique d'insertion, confirmant ainsi le chimérisme

de la lignée germinale des parents F0. Le niveau d'expression de la protéine exogène était également différent en fonction des mâles F1 positifs, confirmant ainsi la variation du niveau d'expression du transgène dû soit à l'état de la chromatine du lieu d'insertion, soit à la présence d'un nombre de copies variables. Notons cependant que les deux fratries issues des mâles F0 n°4 et 128 présentaient un plus fort taux d'expression de hSTAT3 que les deux mâles n°180 et 175 descendants respectivement des femelles F0 n°35 et 109.

VI.4. Stabilité du transgène

Toutes les études de l'effet du transgène ont été réalisées sur des embryons F2 issus du croisement des 4 mâles F1 hétérozygotes choisis avec des femelles sauvages. Ces embryons F2 étaient donc soit hétérozygotes pour le transgène, soit sauvages, avec une proportion d'environ 50%-50%. Cette répartition a toujours été globalement observée dans les expériences réalisées directement sur embryons, les quelques écarts constatés pouvant être expliqués par la perte inévitable d'embryons lors de leur manipulation et des problèmes de définition de seuil de détection de la protéine lors d'immuno-marquage anti-V5. Par contre, nous avons constaté, au fur et à mesure de l'avancée des expériences, l'apparition d'une très forte hétérogénéité d'expression du transgène entre les embryons issus d'un même père et même au sein des cellules issues d'un même individu. En effet, cette variabilité inter-embryon a tout d'abord été constatée lors des analyses d'expression génique par RT-qPCR sur embryons uniques. De plus, une variabilité d'expression entre cellules d'un même individu a également été constatée par immuno-marquage anti-V5 sur des ICM mis en culture, mais aussi sur des cultures de fibroblastes et de cellules souches mésenchymateuses obtenus à partir de biopsies réalisées sur des lapereaux F2 issus de croisements plus tardifs. Ces variabilités inter- et intra-individus d'expression du transgène n'avaient pas été observées dans les toutes premières expériences visant à caractériser les lignées de lapins transgéniques. Il semble possible que des régulations épigénétiques des transgènes se produisent au cours du temps, et particulièrement au cours du développement embryonnaire, et que ces dernières soient différentes selon les cellules et les sites d'insertion. Cette hétérogénéité des cellules de l'ICM reflète probablement les mécanismes de spéciation des cellules au cours du développement, mais ne devrait pas avoir de conséquence sur la dérivation d'ESC. En effet, la dérivation d'ESC dépend des capacités d'adaptation des cellules de l'ICM à leurs nouvelles conditions de culture, et seules quelques cellules arrivent à cet équilibre et sont à l'origine de lignée. Cependant on peut supposer que l'expression de la protéine hStat3-ER^{T2} apportera un avantage sélectif aux cellules l'exprimant fortement et favorisera leur adaptation en culture.

VI.5. Activation de la protéine transgénique

Le système d'activation de protéines par le duo ER^{T2}/tamoxifène a déjà montré son efficacité dans des ESC de souris (Vallier *et al.*, 2001 ; Bourillot *et al.*, 2009) et de primates (Chen *et al.*, 2015). La vérification de son efficacité dans les vecteurs de transgénèse utilisés a été réalisée à la fois par Western-blot après transfection dans des cellules 293FT et par immuno-marquage anti-V5 sur des fibroblastes ou des embryons issus de lignées transgéniques. Le marquage fluorescent anti-V5 apparaît bien dans le cytoplasme en absence de tamoxifène et dans le noyau en présence de tamoxifène, marquant ainsi

l'activation de la protéine exogène. A l'inverse, le marquage fluorescent anti-Stat3 ne montre pas ou peu de différence selon la présence ou non de tamoxifène, car il marque aussi la protéine endogène qui est exprimée et active dans tous les types cellulaires. Cependant, une incohérence entre les résultats d'immuno-marquage et de génotypage a été constatée plusieurs fois avec une surestimation du nombre de lignées positives pour le transgène, ou une présence de la protéine exogène dans le noyau en absence de tamoxifène. Ces incohérences peuvent s'expliquer par trois problèmes techniques : (i) les cellules possèdent une protéine endogène similaire au tag V5 qui est reconnue par l'anticorps anti-V5 dans les noyaux ; (ii) l'anticorps anti-V5 n'est pas spécifique du transgène et se fixe sur un autre antigène par réaction croisée ; et (iii) des artefacts peuvent influencer et donner un signal fluorescent semblable à celui du marquage d'intérêt. Mais les hypothèses les plus probables sont une erreur de manipulation, une inversion d'échantillon ou une surestimation du signal fluorescent obtenu. La conséquence de ce fait a été une fausse interprétation de l'effet très positif du transgène sur le taux de dérivation des lignées de rbESC, avec un pourcentage de lignées positives atteignant presque 100%, alors qu'il est en réalité que de 25%.

VI.6. Effet du transgène sur la pluripotence des rbESC

L'effet attendu du transgène *hStat3-ER^{T2}* était un renforcement de la voie LIF/gp130/Stat3 endogène et une reprogrammation des rbESC vers l'état naïf comme cela a été le cas des cellules souches pluripotentes de primates (Chen *et al.*, 2015). Cette reprogrammation doit entraîner un changement de morphologie des cellules (Nichols et Smith, 2009), une dépendance au LIF et/ou tamoxifène (Chen *et al.*, 2015) et une modification du transcriptome (Natarajan *et al.*, 2017) et de l'épigénome (Jouneau *et al.*, 2012 ; Takahashi *et al.*, 2017) des cellules avec une activation des gènes de pluripotence naïve et des gènes cibles de Stat3 (Chen *et al.*, 2015). Aucune de ces modifications n'a été constatée pour les lignées transgéniques et surtout aucune différence n'a été observée entre les lignées transgéniques et sauvages. En effet les cellules gardent leur morphologie de cellules à l'état amorcé en formant des colonies plates (Osteil *et al.*, 2016) et ne créent pas des colonies en dôme spécifiques des cellules à l'état naïf (Nichols et Smith, 2009). Les tests de différenciation des cellules réalisés sur cellules nourricières ou matrigel en présence ou en absence de LIF et/ou tamoxifène ne montrent qu'une forte dépendance à la présence des cellules nourricières, mais aucune à l'ajout de LIF et/ou de tamoxifène. Ces résultats sont compatibles avec la dépendance des cellules à l'activine produite par les MEF ou à un autre facteur non déterminé, mais en aucun cas à un effet quelconque du renforcement de la voie LIF. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus précédemment avec le même milieu US qui contient à la fois du FBS et du KOSR et qui permet la dérivation de cellules indifféremment en présence ou en absence de LIF ou de FGF2 (Osteil *et al.* 2016). De plus, l'activation de la protéine transgénique ne permet pas d'activer les gènes cibles de Stat3, ni d'augmenter l'expression des facteurs de pluripotence naïf, renforçant l'idée de l'absence d'effet du renforcement de la voie LIF/gp130/Stat3. Il ne semble pas non plus que la combinaison LIF/tamoxifène induise d'autres voies de signalisation pouvant jouer un rôle sur la pluripotence, comme cela a été observé dans les résultats obtenus par Estaras *et al.*, (2017).

VI.7. Effet du transgène sur la capacité de colonisation des rbESC

La capacité de colonisation de deux lignées de rbESC, une transgénique (221-94-GFP) et l'autre sauvage (248-105-GFP) exprimant le marqueur fluorescent GFP a été comparée par micro-injection dans des embryons au stade morula. En effet, même si les cellules de rongeur à l'état naïf sont les seules capables de coloniser des embryons hôtes, aucune démonstration n'a été faite d'une corrélation complète entre la capacité de colonisation et l'état de pluripotence des cellules (Afanassieff, 2018). De plus, les meilleurs résultats de colonisation obtenus chez le lapin ont été produits par les cellules rbEKA, des rbiPSC surexprimant les gènes *hKLF2* et *hKLF4*, bien qu'elles ne soient pas à l'état naïf et toujours dépendantes de l'activine (Tapponnier *et al.*, en 2017). Cependant, seules quelques cellules fluorescentes vertes ont été observées dans 7% des embryons micro-injectés avec les cellules 221-94-GFP, bien qu'aucun embryon positif n'ait été observé après injection des cellules 248-105-GFP. Ce taux de colonisation très faible et inférieur à celui obtenu avec les cellules rbEKA (26%) démontre que l'expression du transgène *hSTAT3-ER^{T2}* n'a pas amélioré la capacité de colonisation des rbESC. Il est à noter néanmoins que certains embryons n'étaient pas de bonne qualité et présentaient des cellules en cours de dégradation. Il est ainsi probable que le développement embryonnaire et le taux de colonisation soient impactés par l'éthanol contenu dans le tamoxifène (Kalisch-Smith *et al.* 2018 ; Legault *et al.*, 2018). Il serait intéressant de tester cette hypothèse avec d'autres lignées transgéniques. De plus, les caryotypes anormaux des deux lignées micro-injectées peuvent aussi être une cause impliquée dans leur incapacité à coloniser un embryon (Bai *et al.*, 2015). Mais d'autres hypothèses peuvent être considérées (Afanassieff, 2018): (i) les cellules compétentes ne sont pas en quantité suffisante pour avoir une participation efficace dans le développement embryonnaire et sont éliminées; (ii) les cellules de l'embryon entrent en compétition avec les cellules injectées qui sont progressivement éliminées sans doute à cause de leur cycle cellulaire plus long; (iii) les cellules transgéniques perdent leur capacité de différenciation dû à la surexpression du transgène; et (iv) les cellules ne s'intègrent pas aux tissus embryonnaires.

VI.8. Effet des facteurs de croissance sur les embryons

L'étude de facteurs étant susceptibles de modifier le développement des cellules de l'ICM des embryons, a eu pour objectif de définir les conditions de culture favorisant l'expression des gènes de pluripotence et des gènes cibles de Stat3 dans l'embryon. Pour cela, une première étude comparant les effets du tamoxifène, du LIF, de l'activine et du TGF β a été réalisée et n'a montré aucun effet de LIF et/ou du tamoxifène sur les niveaux d'expression des gènes cibles de Stat3. Ainsi, bien que la protéine transgénique soit bien activée par le tamoxifène comme le montrent les immuno-marquages anti-V5, cette activation n'entraîne pas la transcription attendue de ses gènes cibles comme c'est le cas dans les cellules de primates (Chen *et al.* 2015). Ce résultat peut s'expliquer par l'absence de co-facteurs essentiels à ces transcriptions ou par la présence de facteurs répressifs dans les cellules de lapin qui seraient absents dans les cellules murines ou de primates. Néanmoins, la combinaison des 4 facteurs testés a entraîné une petite augmentation de l'expression des quatre gènes étudiés, suggérant que le

TGF β et l'activine pourrait avoir un effet sur la pluripotence des cellules de l'embryon de lapin, comme cela a été montré sur les cellules de l'embryon murin (Xiang *et al.*, 2017 ; Dupont *et al.*, 2017) et humain (Rossant and Tam, 2017 ; Ramos-Ibeas *et al.*, 2018). Cependant le nombre d'échantillons et de gènes étudiés est trop faible pour pouvoir affirmer cette hypothèse. Une étude plus ciblée sur l'effet de ces deux molécules sur l'expression d'autres gènes impliqués dans la pluripotence devrait permettre de confirmer cette hypothèse. Une seconde analyse visant à vérifier l'effet de l'IL6 sur les cellules d'ICM isolés et mis en culture a aussi été réalisée. En effet cette interleukine se fixe sur son récepteur soluble qui se dimérise avec la glycoprotéine gp130, activant la voie Jak2/Stat3 de la même façon que le LIF (Mihara *et al.*, 2012). De plus, des résultats de transcriptomique réalisée sur l'embryon de lapin par Wilhelm Bouchereau, un étudiant en thèse dans le laboratoire, montrent que les cellules du trophectoderme expriment de l'IL6 plutôt que du LIF et que les cellules de l'ICM expriment la gp130 mais pas le récepteur du LIF. Cependant les résultats de RT-qPCR obtenus sur les embryons ne montrent pas plus d'efficacité de la combinaison IL6/IL6R sur l'activation des gènes étudiés que l'utilisation du LIF. De même les combinaisons IL6/IL6R/tamoxifène et LIF/tamoxifène n'activent pas l'expression des gènes étudiés, montrant l'inefficacité des voies Stat3 endogène et exogène à améliorer la pluripotence des cellules de l'ICM de lapin.

VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Mon projet d'étude visant à obtenir des cellules souches pluripotentes naïves à partir de lapins transgéniques inducteurs de la pluripotence n'a pas abouti aux résultats escomptés. En effet, le renforcement de la voie LIF/gp130/Stat3 par la surexpression d'une forme hormono-dépendante de la protéine humaine Stat3 ($hStat3-ER^{T2}$) n'a pas permis d'améliorer l'état de pluripotence des lignées de rbESC obtenues, bien que cette stratégie ait montré son efficacité chez les cellules de primate (Chen *et al.* 2015). Les lignées transgéniques de rbESC ne montrent aucune différence avec les lignées sauvages au niveau de leur morphologie, leur dépendance aux cellules nourricières et leur expression de gènes de pluripotence ou de gènes cibles de Stat3, bien que le transgène humain soit exprimé et la protéine exogène soit activée par le tamoxifène. Il apparaît donc que les stratégies utilisées chez les rongeurs et les primates pour obtenir des ESC à l'état naïf ne fonctionnent pas chez le lapin (Afanassieff *et al.*, 2019) (Annexe 2). Ainsi, bien que les gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence soient identiques entre les diverses espèces de mammifère, il semble que les voies de signalisation activant ces gènes diffèrent de façon importante (Afanassieff, 2018). Il s'avère donc nécessaire d'élucider le fonctionnement et les mécanismes spécifiques de la pluripotence chez le lapin, et de mettre au point des conditions de culture spécifiques et adaptées à cette espèce, qui permettront de stabiliser l'état de pluripotence naïf *in vitro*. En effet, toutes les expériences réalisées au cours de mon stage ont été basées sur le milieu de culture appelé US qui permet de maintenir les cellules de l'ICM en culture sans facteurs de croissance mais avec un des modifications importantes du caryotype (Osteil *et al.* 2016). Il faut probablement revoir entièrement la composition du milieu utilisé afin de favoriser le maintien de la pluripotence naïve des cellules de l'ICM, sans partir sur des données obtenues chez d'autres espèces. Dans ce but, deux programmes de recherche ont été lancés dans le laboratoire : (i) l'étude du transcriptome des cellules de l'embryon de lapin avant l'implantation, soit du stade morula compacté (E3.0) au stade pré-gastrula (E6.6) ; ce travail est réalisé par le doctorant Wilhelm Bouchereau ; et (ii) le test de différents milieux et inhibiteurs lors de la dérivation de rbESC. Une étude préliminaire réalisée par une étudiante en Master 2, Hong Thu Pham, a déjà permis de définir un milieu qui permet de dériver des rbESC sur matrigel dans un milieu N2B27 conditionné sur cellules nourricières et contenant de la Vitamine C, de l'activine, du LIF, et deux inhibiteurs, celui des TNK (XAV939) et celui des PKC (Gö6983), milieu appelé VAL2i. Il sera intéressant d'étudier l'effet du transgène $hStat3-ER^{T2}$ dans ce nouveau milieu qui est capable de maintenir une expression forte du gène *Oct4* dans les cellules de l'ICM en culture. Notons cependant que les cellules de lapin ont besoin d'activine et/ou d'autres facteurs produits par les cellules nourricières pour être maintenues en culture puisque le conditionnement du milieu est indispensable au maintien de l'état indifférencié des cellules. Cet état de fait a également été constaté pour les cellules de primates dont la plupart des stratégies de reprogrammation vers l'état naïf utilise des cellules nourricières et/ou de l'activine (Daheron *et al.*, 2004 ; Guo *et al.*, 2006 ; Gafni *et al.*, 2013).

En conclusion, bien que les résultats obtenus soient décevants, mon travail a contribué à modifier la conception des expériences à réaliser pour parvenir à créer des lapins chimériques en se basant sur quatre éléments fondamentaux : (i) le découplage possible entre l'état de pluripotence et l'aptitude à produire des chimères ; (ii) la probabilité d'une régulation des états de pluripotence spécifique de cette

espèce ; (iii) l'impossibilité de généraliser une technique de reprogrammation ou de réversion obtenue sur une espèce donnée ; (iv) l'importance des statuts épigénétique et métabolique des PSC micro-injectées. Des stratégies se basant sur ces principes sont appliquées actuellement au laboratoire dans différents projets développés sur l'espèce lapin et coordonnés par Marielle Afanassieff et Nathalie Beaujean. Ces projets visent à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le maintien de la pluripotence au niveau transcriptomique mais aussi épigénétiques, ainsi qu'à étudier le cycle cellulaire et le métabolisme des cellules pluripotentes dans l'embryon de lapin. L'ensemble des résultats de ces différents projets, devrait permettre de définir des facteurs de transcription, des modificateurs épigénétiques et des petites molécules permettant de promouvoir la pluripotence naïve des cellules de lapin en culture.

VIII. RÉFÉRENCES

- Afanassieff, M. 2018. Cellules souches pluripotentes et création de chimères germinales chez le lapin. Habilitation à diriger les recherches. Université De Lyon.
- Afanassieff, M., Gavin-Plagne, L., Perold, F., Voisin, S., Synara, S. C., Buff, S., Savatier, P., Joly, T. 2019. Interest of rabbit induced pluripotent stem cells for species preservation. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 49(Sup.2):103-107.
- Avilion, A. A., Nicolis S. K., Pevny L. H., Perez L., Vivian N., Lovell-Badge R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development on SOX2 function. *Genes Dev.*, 17:126–140.
- Bai Q, Ramirez JM, Becker F, Pantesco V, Lavabre-Bertrand T, Hovatta O, et al. 2015. Temporal analysis of genome alterations induced by single-cell passaging in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.*, 24(5):653-62
- Burdon, T. Smith, A., Savatier, P. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol*, 12(9) :432-438.
- Boroviak T, Loos R, Lombard P, Okahara J, Behr R, Sasaki E, et al. 2015. Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. *Dev Cell.*, 35(3):366-82.
- Bourillot, P. Y. Aksoy I., Schreiber V., Wianny F., Schulz H., Hummel O., Hubner N., Savatier P. 2009. Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells*, 27, pp.1760–1771.
- Bourillot, P. Y. & Savatier, P. 2010. Kruppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC Biol.*, 8:125-127.
- Bosze, Z., Major, P., Baczko, I., Odening, K. E., Bodrogi L., Hiripi L., Varro, A. 2016. The potential impact of new generation transgenic methods on creating rabbit models of cardiac diseases. *Prog Biophys Mol Biol* 121(2):123-130.
- Brons L. G. M., Smithers L. E., Trotter M. W. B., Rugg-Gunn P., Sun B., Chuva de Sousa Lopes S. M., Howlett S. K., Clarkson A., Ahrlund-Rinchter L., et Pedersen R., 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cell from mammalian embryos. *Nature*, 448:191-195.
- Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., and Smith A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113: 643–655.
- Chen H., Aksoy I., Gonnot F., Osteil P., Aubry M., Hamela C., Voisin S., Fontaine E., Mure M., Afanassieff M., Aclouque H., Genthon C., De Vos J., Sanlaville D., Guérin J. F., Bourillot P. Y., et Savatier P. 2015. Reinforcing STAT3 activity reprograms human embryonic stem cells to naïve pluripotency. *Nature Communications*, 6:7095-7111.
- Chesné P., Adenot P. G., Viglietta C., Baratte M., Boulanger L., Renard J. P. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol.*, 4:366-369.
- Daheron, L., Opitz S. L., Zaehres H., Lensch M. W., Andrews P. W., Itskovitz-Eldor J., Daley G. Q. 2004. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 22(5): 770-778.

- Duranthon V., Beaujean N., Brunner M., Odening K. E., Santos A. N., Kacs Kovics I., Hiripi L., Weinstein E. J., Bosze Z. 2012. On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. *Transgenic Research*, 21:699–713.
- Dupont C., Loos F., Kong-A-San J., Gribnau J. 2017. FGF treatment of host embryos injected with ES cells increases rates of chimaerism. *Transgenic Research*. 26(2):237-246.
- Evans M. J., & Kaufman, M. H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819):154-156.
- Estaras, C., Hsu H. T., Huang L., Jones K. A. 2017. YAP repression of the *WNT3* gene controls hESC differentiation along the cardiac mesoderm lineage. *Gene Dev.*, 31(22):2250-2263.
- Fisher B., Chavatte-Palmer P., Viebahn C., Navarrete Santos A., Durathon V. 2012. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction.*, 144(1):1-10.
- Gafni O., Weinberger L., Mansour A. A., Manor Y. S., Chomsky E., Ben-Yosef D., Kalma Y., Viukov S., Maza I., Zviran A., Rais Y., Shipony Z., Mukamel Z., Krupalnik V., Zerbib M., Geula S., Caspi I., Schneir D., Shwartz T., Gilad S., Amann-Zalcenstein D., Benjamin S., Amit I., Tanay A., Massarwa R., Novershtern N., Hanna J. H. 2013. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*, 504(7479):282-6.
- Giles J. R., Yang X., Mark W., Foote R. H. 1993. Pluripotency of cultured rabbit inner cell mass cells detected by isozyme analysis and eye pigmentation of fetuses following injection into blastocysts or morulae. *Mol Reprod Dev.*, 36(2):130-8.
- Graur D, Duret L, Gouy M. 1996. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature*, 379(6563):333-335.
- Gordon, J.W. & Ruddle, F.H., 1983. Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol*, 101:411-433.
- Guo G., von Meyeen F., Santos F., Chen Y., Reik W., Bertone P., Smith A., Nichols J., 2006. Naive Pluripotent Stem Cells Derived Directly from Isolated Cells of the Human Inner Cell Mass. *Stem Cell Reports.*, 4:437-446.
- Guo, G. Yang J., Nichols J., Hall J. S., Eyres I., Mansfield W., Smith A. 2009. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*, 136:1063–1069.
- Guo G., & Smith A. 2010. A genome-wide screen in EpiSCs identifies Nr5a nuclear receptors as potent inducers of ground state pluripotency. *Development*. 137(19):3185-3192.
- Hall J., Guo G., Wray J., Eyres I., Nichols J., Grotewold L., Morfopoulou S., Humphreys P., Mansfield W., Walker R., Tomlinson S., Smith A. 2009. Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Krüppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*. 5(6):597-609.
- Hanna J., Markoulaki S., Mitalipova M., Cheng A. W., Cassady J. P., Staerk J., Carey B. W., Lengner C. J., Foreman R., Love J., Gao Q., Kim J., Jaenisch R. 2009. Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell Stem Cell*. 4(6):513-524.
- Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad C. E. Jr, Wall R. J., Bolt D. J., Ebert K. M., Palmiter R. D., Brinster R. L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315:680-683.

- Hore T. A., Von Meyenn F., Ravichandran M., Bachman M., Ficiz G., Oxley D., Santos F., Balasubramanian S., Jurkowski T. P., Reik W. 2016. Retinol and ascorbate drive erasure of epigenetic memory and enhance reprogramming to naïve pluripotency by complementary mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(43):12202-12207.
- Honda A., Hirose M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Shimosawa N., Hatori M., Shimizu N., Murata T., et Katayama K., 2008. Stable embryonic stem cell lines in rabbits : potential small animal models for human research. *Reprod Biomed Online.* 17(5):706-715.
- Honda, A. Hatori M., Hirose M., Honda C., Izu H., Inoue K., Hirasawa R., Matoba S., Togayachi S., Miyoshi H., Ogura A. 2013. Naive-like conversion overcomes the limited differentiation capacity of induced pluripotent stem cells. *Journal of Biological Chemistry,* 288:26157–26166.
- Honda A., & Ogura A. 2017. Rabbit models for biomedical research revisited via genome editing approaches. *The Journal of reproduction and development.* 63(5):435-438.
- Houdebine, J. M. 2009. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.,* 32(2):107-121.
- Humphrey, R. K., Beattie, G. M., Lopez, A. D., Bucay, N., King, C. C., Firpo, M. T., Rose-John, S., Hayek, A. 2004. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells,* 22(4):522-530.
- Illich D. J., Zhang M., Ursu A., Osorno R., Kim K. P. , Yoon J., Araúzo-Bravo M. J., W. G., Esch D., Sabour D., Colby D., Grassme K. S. , Chen J., Greber B., Höing S., Herzog W., Ziegler S., Chambers I., Gao S., Waldmann H., Schöler H. R. 2016. Distinct Signaling Requirements for the Establishment of ESC Pluripotency in Late-Stage EpiSCs. *Cell Rep.,* 15(4):787-800.
- Intawicha, P. Ou Y. W., Lo N. W., Zhang S. C., Chen Y. Z., Lin T. A., Su H. L., Guu H. F., Chen M. J., Lee K. H., Chiu Y. T., Ju J. C. 2009. Characterization of embryonic stem cell lines derived from New Zealand white rabbit embryos. *Cloning and stem cells,* 11(1):27–38.
- Jouneau A, Ciaudo C, Sismeiro O, Brochard V, Jouneau L, Vandormael-Pournin S, et al. Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles. *RNA.* 2012;18(2):253-64
- Kalisch-Smith, J. I., & Moritz, K. M. 2018. Detrimental effects of alcohol exposure around conception: putative mechanisms. *Biochem. Cell. Biol.,* 96(2):107-116.
- Keller, G.M., 1995. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Current Opinion in Cell Biology,* 7:862–869.
- Kopp, J. L., Ormsbee B. D., Desler M., Rizzino A. 2008. Small Increases in the Level of Sox2 Trigger the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells,* 26(4):903–911.
- Legault, L. M., Bertrand-Lehouillier, V., McGraw, S. 2018. Pre-implantation alcohol exposure and developmental programming of FASD: an epigenetic perspective. *Biochem Cell Biol,* 96(2):117-130.
- Metzger D., Clifford J., Chiba H., Chambon P. 1995. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl. Acad. Sci. USA,* 92(15):6991-6995.
- Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. 2012. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond),* 122(4):143–159.

- Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M., Yamanaka S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113:631–642.
- Moens A., Betteridge K. J., Brunet A., Renard J. P. 1996. Low levels of chimerism in rabbit fetuses produced from preimplantation embryos microinjected with fetal gonadal cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 43(1):38-46.
- Natarajan, K. N., Teichmann, S. A., Kolodziejczyk, A. A. 2017. Single cell transcriptomics of pluripotent stem cells: reprogramming and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 46:66-76.
- Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Schöler H., Smith A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95:379–391.
- Nichols J., & Smith A., 2009. Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell*, 4(6):487–492.
- Niwa H., Miyazaki J., Smith A. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics*. 24 : 372–376.
- Niwa H., Burdon T., Chambers I., Smith A. 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & development*, 12:2048–2060.
- Okashita N., Suwa Y., Nishimura O., Sakashita N., Kadota M., Nagamatsu G., Kawaguchi M., Kashida H., Nakajima A., Tachibana M., Seki Y. 2016. PRDM14 Drives OCT3/4 Recruitment via Active Demethylation in the Transition from Primed to Naive Pluripotency. *Stem Cell Reports*. 7(6):1072-1086.
- Osteil P., Tapponnier Y., Markossian S., Godet M., Schmaltz-Panneau B., Jouneau L., Cabau C., Joly T., Blachère T., Gócza E., Bernat A., Yerle M., Acloque H., Hidot S., Bosze Z., Duranthon V., Savatier P., Afanassieff M. 2013. Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naive pluripotency. *Biology OPEN*. 2(6):613-28.
- Osteil, P. 2013. Etude de la pluripotence des cellules souches embryonnaires de lapin. Thèse de doctorat. EDISS. Université de Lyon
- Osteil P., Moulin A., Santamaria C., Joly T., Jouneau L., Aubry M., Tapponnier Y., Archilla C., Schmaltz-Panneau B., Lecardonnel J., Barasc H., Mouney-Bonnet N., Genthon C., Roulet A., Donnadiou C., Acloque H., Gocza E., Duranthon V., Afanassieff M., Savatier P. A Panel of Embryonic Stem Cell Lines Reveals the Variety and Dynamic of Pluripotent States in Rabbits. *Stem Cell Reports*. 7(3):383–398.
- Qiu D., Ye S., Ruiz B., Zhou X., Liu D., Zhang Q., Ying Q. L. 2015. Klf2 and Tfcp2l1, Two Wnt/ β -Catenin Targets, Act Synergistically to Induce and Maintain Naive Pluripotency. *Stem Cell Reports*. 5(3):314-322.
- Ramos-Ibeas, P., Nichols, J., Alberio, R. 2018. States and Origins of Mammalian Embryonic Pluripotency In Vivo and in a Dish. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 128:151-179.
- Rathjen J., Lake J. A., Bettess M. D., Washington J. M., Chapman G., Rathjen P. D. 1999. Formation of a primitive ectoderm like cell population, EPL cells, from ES cells in response to biologically derived factors. *Cell Sci.* (5) : 601-12.
- Rossant, J., & Tam, P. P. 2017. New Insights into Early Human Development: Lessons for Stem Cell Derivation and Differentiation. *Cell Stem Cell*, 20(1):18-28.

- Schoonjans L., Albright G. M., Li J. L., Collen D., Moreadith R. W. 1996. Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat chimeras following injection into blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.*, 45(4):439-43.
- Silva J., Nichols J., Theunissen T. W., Guo G., Van Oosten A. L., Barrandon O., Wray J., Yamanaka S., Chambers I., Smith A. 2009. Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell*. 138(4):722–737.
- Smith A., Heath J. K., Donaldson D. D., Wong G. G., Moreau J., Stahl M., Rogers D. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336:688-690.
- Takahashi S, Kobayashi S, Hiratani I. 2017. Epigenetic differences between naive and primed pluripotent stem cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 75(7):1191-1203.
- Takahashi K., et Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126(4):663-676.
- Takahashi K., Okita K., Nakagawa M., Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature Protoc.* 2(12):3081-3089.
- Tapponnier Y., Afanassieff M., Aksoy I., Aubry M., Moulin A., Medjani L., Bouchereau W., Mayère C., Osteil P., Nurse-Francis J., Oikonomakos I., Joly T., Jouneau L., Archilla C., Schmaltz-Panneau B., Peynot N., Barasc H., Pinton A., Lecardonnell J., Gocza E., Beaujean N., Duranthon V., Savatier P. 2017. Reprogramming of rabbit induced pluripotent stem cells toward epiblast and chimeric competency using Krüppel-like factors. *Stem Cell Res.*, 24:106-117.
- Thompson, S., Clarke, A. R., Pow, A. M., Hooper, M. L., Melton, D. W. 1989. Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell*, 56(2):313-321.
- Thomson J. Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., Becker R. A., Hearn J. P. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *PNAS USA*, 92(17):7844–7848.
- Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., Hearn J. P. 1996. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol. Reprod.*, 52(2): 254-259.
- Thomson J. A., Ttskovitz-Eldor J., Shapiro S. Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. 1998. Embryonic stem cells lines derived from human blastocyst. *Sciences*, 282(5391):1145-1147.
- Tsukiyama T. and Oshinata Y. 2014. A modified EpiSC culture condition containing a GSK3 inhibitor can support germline-competent pluripotency in mice. *PLoS One*. 9(4):e95329.
- Vallier L., Mancip J., Markossian S., Lukaszewicz A. Dehay C., Latzger P., Chambon P., Samarut J., Savatier P. 2001. An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cell and their in vitro and in vivo differentiated derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(5):2267-2272.
- Vallier L., Alexander M., Pedersen R. A. 2005. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*. 118:4495–4509.
- Wakayama T., Perry A. C., Zuccotti M., Johnson K. R., Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*. 394:369–374.

- Wang S., Shen Y., Yuan X., Chen K., Guo X., Chen Y., Niu Y., Li J., Xu R. H., Yan X., Zhou Q., Ji W. 2008. Dissecting signaling pathways that govern self-renewal of rabbit embryonic stem cells. *Journal of Biological Chemistry*. 283(51):35929–35940.
- Wang, S., Tang, X., Niu, Y., Chen, H., Li, B., Li, T., Zhang, X., Hu, Z., Zhou, Q., Ji, W. 2007. Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25(2):481-489.
- Williams, R. L., Hilton D. J., Pease S., Willson T. A, Stewart C. L., Gearing D. P., Wagner E. F., Metcalf D., Nicola N. A., Gough N. M. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cell. *Nature*. 336:684-687.
- Wilmut A. E., Schnieke J., McWhir, A. J., Kind et K. H. S. Campbel. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385:810-813.
- Xiang J., Cao S., Zhong L., Wang H., Pei Y., Wei., 2017. Pluripotent stem cells secret Activin A to improve their epiblast competency after injection into recipient embryos. *Protein Cell*, 9(8):717-728.
- Yang Z. D., and Foote R. H. 1988. Production of chimeric rabbits from morulae by a simple procedure. *Gamete Res*. 21(4):345-351.
- Yang D., Song J., Zhang J., Xu J., Zhu T., Wang Z., Lai L., Chen Y. E. 2016. Identification and characterization of rabbit ROSA26 for gene knock-in and stable reporter gene expression. *Sci Rep*. 6:25161.
- Yang J. van Oosten A. L., Theunissen T. W., Guo G., Silva J. C., Smith A. 2010. Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency. *Cell Stem Cell*. 7(3):319–328.
- Yang, D., Xu, J., Chen, Y. E. 2019. Generation of Rabbit Models by Gene Editing Nucleases. *Methods Mol. Biol.*, 1874:327-345
- Yeo J. C. Jiang J., Tan Z. Y., Yim G. R., Ng J. H., Göke J., Kraus P., Liang H., Gonzales K. A., Chong H. C., Tan C. P., Lim Y. S., Tan N. S., Lufkin T., Ng H. H. 2014. Klf2 is an essential factor that sustains ground state pluripotency. *Cell Stem Cell*, 14(6):864–872.
- Yoshida, K., Chambers, I., Nichols, J., Smith, A., Saito, M., Yasukawa, K., Shoyab, M., Taga, T., Kishimoto, T. 1994. Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. *Mech. Dev.*, 45(2):163-171.
- Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., Hirabayashi, T., Yoneda, Y., Tanaka, K., Wang, W. Z., Mori, C., Shiota, K., Yoshida, N., Kishimoto, T. 1996. targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *PNAS USA*, 96(1):407-411.

IX. ANNEXES

Annexe 1 (p.77) : Tableau des amorces utilisées en qPCR

Annexe 2 (p.78) : Proceeding of Marielle Afanassieff's presentation at the 14th Asian Reproductive Biotechnology Congress, published in the *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 2019, 49(Sup.2): 103-107.

Annexe 1 : Tableau des amorces utilisées en qPCR

| Gène | Amorce Sens (F) | Amorce Anti-sens (R) |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>Tbp</i> | TCACCCACCAGCAGTTCAG | CGATTCTGGGTTTGATCATTCTGTAG |
| <i>Stat3ER</i> | CAGATGGTCAGTGCCTTCTTG | GCCCATCATCGAAGCTTCAC |
| <i>Stat3</i> | CTTCTGCAAGAGTCCAATGTTC | GATTCGGGCAATCTCCATTGG |
| <i>cMyc</i> | AAGGTCAGGTCACCATCTG | AGACGTGGCACCTCTTGAG |
| <i>cFos</i> | GGGACAGCCTCTCCTACTAC | AGTCACGGTGGGGATGAAG |
| <i>Klf4</i> | CGCTACTCCCGTCTTCTC | GGGGAGTCGTTTCATGTG |
| <i>Klf5</i> | CTGGCTGCACAAAAGTTTATACAAAG | GTGCACTTGACGGCTTCTC |
| <i>Klf17</i> | AGAATTTAACCCACCGCCA | TGACGGGTTGGATGTTTTGC |
| <i>Socs2</i> | GAGAACCAAGATGCACAAC | CCGTCTCCGACAAAAGTTCC |
| <i>Socs3</i> | GCATCTCTGCCGGAAGAC | TCCAGGAACCTCCGAATTGG |
| <i>Socs17</i> | CGACCAATGGAATGCCTTCATG | CACGAAGGGCCGCTTTTC |
| <i>Oct4</i> | GCAGCAGATCAGCCACATC | AACAGTCACTGCTTGATCGTTTG |
| <i>Nanog</i> | CACATGATGCCCCTGGTGCCC | AGCGGAGAGGCGGTGTCTGT |
| <i>Cdx2</i> | AAAACCAGGACGAAAGACAAATACC | TCCTGCGGATGGTGATGTAG |
| <i>Gata4</i> | CCTCTTGGCAGTCCGAAAG | TGGCGTCTGGATTGTTAAGATTC |
| <i>Gata6</i> | AATTCAGACCAGGAAACGAAAACC | GGAGTCATAGGAACGGAATTATTGC |
| <i>Cyp1b1</i> | GTCATGGCCTTTCTCTACGAAAC | GGTTAACGAAGATCACCGTGTTTC |
| <i>Gbx2</i> | GGCAAAGGCTTTCTGTCTAAGG | CACCTTTGGCTCGTCTTTCC |
| <i>Gp130</i> | CCCTGCCTGTGACTTTCAAG | CAAAGCTTGTTATCTTTGGGAATGC |
| <i>LifR</i> | TCCCCACCATCCAGAATAGC | ATCACATAGTCGCACGTCAATTTG |
| <i>Tfcp2l1</i> | AGGTTCTCACAGTTCTGCCG | GAAGAGCCGGATCCCATCTG |
| <i>Pdgfra</i> | CAAGAAGGAGCTGGACATCTTTG | GTAGTCACCATTGTTCTCGAAAGAC |
| <i>Krt8</i> | ATCGAGATCGCCACCTACAG | CTGGTGTGGATACTCATGTTCTG |
| <i>Zfp36</i> | CAAGACTGAACTCTGCCACAAG | GCTGGGTTGTGGATGAAG |
| <i>Dppa2</i> | CAGGACTAGAAGACAACATGTTATGC | CCCACTGACATTAATCTTCTCATCATC |
| <i>Dppa3</i> | GATTCTTCTTAACGTACCAGTATTAC | CACCTTAACTTCGTTAGGATCATCTC |
| <i>Dppa5</i> | GTTTACGGCTCTACATGTACAAG | CCCATGGCTTCTCAAGTTTG |
| <i>Essrg</i> | AAGGCATTCTTCAAGAGGACAATTC | GTCTGCGCTTTGTGATTTAC |
| <i>Ooep</i> | GAACCGGTGAAGAGCATTTC | GAACTCCTCAAGGTGCTTCATC |
| <i>Otx2</i> | GGAGGTGGCGCTGAAAATC | TTTGTCTGACCACCATTCTGTTG |
| <i>Piwil2</i> | CCTTTTCTGCTGGCTGATG | AGTTTTCTTGTCTGCTGATACATG |
| <i>Rex1</i> | GGAAGGGCTCTGGTGGAAAAGC | CGGAAGGCCCATGTCGTGTTG |
| <i>Sall4</i> | CGACGCCCTGAAGACCTTAG | GGTAGCTTGCCTTGCTTCAAAG |
| <i>Essrb</i> | AGCCCGTACCTGAGCTTAC | AGGAGGCATGGCGTACAG |
| <i>Prdm14</i> | GGTCTGATTGCTTCTCAAAC | AATGCGAGACTTTCCAAACATC |
| <i>Fgf4</i> | GAGCAGCAAGGGAAAACACTACG | TAGTTGTTCCGGTAGCAGGATCTC |
| <i>Fgf5</i> | CTCCACGAAGCCAATATGTTAAG | TTGTTGCTGAAAACCTCTCGTATTTC |
| <i>Fbxo15</i> | ACAGAGAACACCTACCTTATTGG | GGGAACCAAGCACCAGAAAAG |
| <i>Lefty2</i> | CCGCGGGAAGAGGTTTCAG | GCTTCTCCATGCCGAACAC |
| <i>Cer1</i> | TCATCTTGCCCATCAAAGTCATG | TGGGTGATAGTCTGGCTGAAG |
| <i>Gdf3</i> | GTGGGAACATGCTTCGACTTC | CAAAAGTTGTCTTGGGAAAGTTTCTTG |
| <i>Pecam1</i> | AGCGAGACCGTGTGAGATC | GCTTTATTTTCGTTTACTGGCTTCATG |
| <i>Pum1</i> | CCGCTACCCCAATTTACAACCTG | AGCCTGGAGATTTTCATTGAAAAC |
| <i>Pitx2</i> | CCGAGCTGTGCAAGAATGG | GCCCAGTTGTTGTAGGAATAGC |
| <i>Tbra</i> | AGCAAAGTCAAGCTACCAATAAG | TCCGGGGCTCATACTTGTG |
| <i>Tbx3</i> | CTCCAGCAGCACGTCTTG | TACGTGTACGGATAAGGGAAACAG |
| <i>Tet1</i> | GTGGCTACAACGAAAGATACAGAAG | GGTGTGTATAATATGGCCTTTGTC |
| <i>Tet2</i> | CACCTGTCAAGACTCAATATGATTTCC | GATTTCTCTAATAGCTGCCACATTAGG |

Interest of rabbit induced pluripotent stem cells for species preservation

¹Marielle Afanassieff*, ^{1,2}Lucie Gavin-Plagne, ¹Florence Perold, ¹Sophie Voisin, ¹Synara Moreira, ²Samuel Buff, ¹Pierre Savatier, ²Thierry Joly

¹Univ Lyon, Université Lyon 1, Inserm, Stem Cell and Brain Research Institute U1208, Inra USC 1361, Bron, France; ²Univ Lyon, Université Lyon 1, VetAgro Sup, ISARA-Lyon, UPSP ICE 2011-03-101, Marcy l'Etoile, France.

*Corresponding author: marielle.afanassieff@inserm.fr

Keywords: rabbit, iPSCs, skin biopsy, cryopreservation, CRYO3

Introduction

According to the United Nations Food and Agriculture Organization, about one-third of all domestic animal strains are threatened with extinction (1). The loss of biodiversity due to the increase in the selection and breeding of animals led to the creation in 2012 of a French national network to bring together the various centers of biological resources (CRBs) for domestic animals. This infrastructure, called CRB-anim (2) and managed by the French National Institute for Agricultural Research, aims to preserve the biodiversity of different mammals, birds, fishes, and shellfishes that are raised for the food industry. One of its research axes is to develop a method for the cryopreservation of somatic tissues and their use for reproduction through the technology of induced pluripotent stem cell (iPSC).

iPSCs are obtained through the genetic reprogramming of adult somatic cells, such as cutaneous fibroblasts, by overexpressing specific pluripotent genes, including *OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, and *c-MYC* (3). The resulting cells have the same properties as that of embryonic stem cells (ESCs) that originate from the inner cell mass of blastocyst-stage embryos (4). They are notably able to self-renew (i.e., to multiply indefinitely and identically in culture) and are pluripotent (i.e., capable of differentiating into cells characteristic of the three germ layers). Mice iPSCs, such as murine ESCs, can colonize a host embryo and participate in the development of all tissues, including the germ line (5). Therefore, the resulting chimera mice can transmit the genetic heritage of the original somatic cells to their offspring (Figure 1). In addition, mouse iPSCs can be differentiated in culture into male (6) or female (7) functional gametes, which, in turn, can be used to produce embryos via *in vitro* fertilization. Finally, iPSCs can be used as nucleus donor cells for nuclear transfer cloning (8).

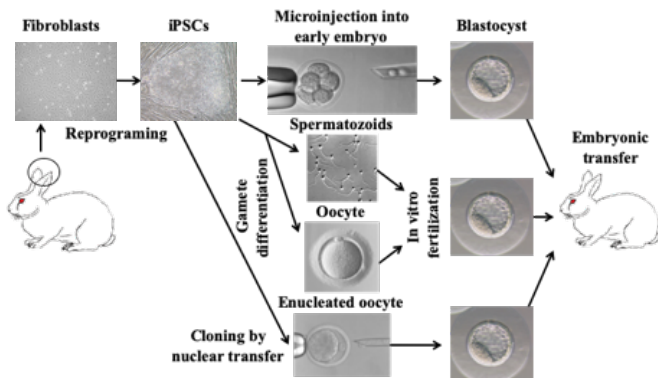


Figure 1: Schematic representation of future reproductive biotechnologies using iPSCs for species preservation.

In rabbits, iPSC lines were obtained by infecting either embryonic cells of the liver or the intestine (9) or adult ear fibroblasts (10), with recombinant retroviruses carrying the four human classical genes, including *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, and *c-MYC* (11). These rabbit iPSCs, as rabbit ESCs, exhibit the cardinal features of PSCs but are unable to colonize host embryos to produce germinal chimeras. This difference between rabbit and mouse iPSCs is due to their ability to self-renew in two distinct states of pluripotency, namely, the primed and naïve states, respectively (12). The naïve state of pluripotency is exemplified by mouse ESCs that self-renew due to the LIF/gp130/Stat3 signaling pathway. However, in other mammal species, including rabbits and primates, PSCs exist in the primed state of pluripotency, characterized by fragile self-renewal under the activin/TGFβ/SMAD signaling pathway, epigenetic heterogeneity and genetic instability (13). Most research studies on primate PSCs are currently aimed at reprogramming primed cells toward the naïve state of pluripotency by forcing them to use the functional molecular processes of mouse ESCs. Several possible modifications have already been tested on human iPSCs and appear promising (14, 15). One such strategy tested on rabbit iPSCs has significantly improved their rate of embryonic colonization (16) (Figure 2); however, these are still insufficient to ensure the production of germ chimeras and, thus, the use of iPSCs for species conservation.

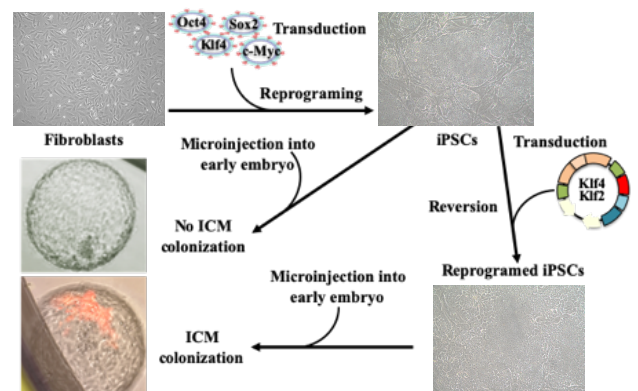


Figure 2: Schematic representation of the current state-of-art rabbit iPSC reprogramming and chimeric capacity; ICM = Inner Cell Mass

To achieve this objective, we have developed three lines of research: (i) defining the conditions for the cryo-preservation of somatic tissues, (ii) reprogramming adult cells without the genomic integration of transgenes, and (iii) reverting rabbit iPSCs toward the naïve state. This article aims to provide an overview of the progress and the technical limitations of these research programs.

Materials and Methods

Cryopreservation of somatic tissues: The ears of euthanized New Zealand White rabbits were either treated directly or kept at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS) + 1% penicillin/streptavidin/glutamine (PSG) for 48 h. The ears were dissected to separate the skin from the internal cartilage. Both tissues were cut into small (3 mm²) or large (1 cm²) pieces, washed in PBS-PSG, and frozen in CRYO3 (Stem alpha, France, #5617) or fetal bovine serum (FBS; Hyclone) with 4% or 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) in a rate-controlled freezer (Cryologic CL8800i) using a cooling rate of 1°C/min until -80°C. Cryovials were then dipped into liquid nitrogen for storage. After at least 2 weeks, cryovials were thawed at 37°C directly from liquid nitrogen to a water bath until the last ice crystals melted. Tissue pieces were then diluted by the addition of 10 ml of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) drop by drop, centrifugated 5 min at 300 g, and transferred to culture dishes with fibroblast culture medium [DMEM + 20% FBS + 1% PSG + 0.2% β-mercaptoethanol (50mM) + 1% non-essential amino acids (NEAA); most components were purchased from Invitrogen]. Primary cultures of rabbit fibroblasts were passaged with trypsin-EDTA when they reached the confluency, and the times between the two first passages were recorded. Cells were then frozen in usual conditions, i.e., with 90% FBS + 10% DMSO in a freezing container, and analyzed after thawing for their survival rate by propidium iodide incorporation, their growth rate by culture during six passages, and their capacity to produce iPSCs by transduction with a Sendai viral vector coding the green fluorescent protein (GFP; CytoTune-EmGFP Sendai Fluorescence Reporter, Life Technologies #A16519).

Reprogramming with non-integrating Sendai viral vectors: Blood samples from adult rabbits were collected into BD Vacutainer tubes containing heparin. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated on Ficoll gradient (Lymphoprep, Sigma #100771) and expanded for 2 weeks in StemSpan medium (Stem Cell Technologies #09600) containing erythropoietin (2 U/mL), insulin-like growth factor-1 (40 ng/mL), stem cell factor (50 ng/mL), interleukin-3 (10 ng/mL), dexamethasone (1.5 μM), ascorbic acid (50 ng/mL; all molecules were purchased from Peprotech), and 1% PSG. Rabbit fibroblasts and PBMCs were transduced with Sendai viral vectors expressing human *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, and *c-MYC* genes according to the manufacturer's instructions (CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, Life Technologies #A16517). Transduced cells were plated on culture dishes containing mitomycin-treated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) with PSC culture medium [DMEM/F-12 + 20% knockout serum replacement (Invitrogen) + 1% PSG + 1% NEAA (10 mM) + 1% sodium pyruvate (100 mM) + 0.2% β-mercaptoethanol (50 mM) + human recombinant fibroblast growth factor-2 (10 ng/mL; Millipore, #10828)]. PSC medium was replenished every 2 days for 10-30 days until the appearance of iPSC colonies. These were mechanically isolated for expansion on feeder cells in PSC medium.

Rabbit iPSC reversion toward the naïve state: A rabbit iPSC line expressing the *GFP* gene under the ubiquitous CAG promoter was obtained by cell transduction with a defective

recombinant lentiviral vector (17). These GFP-iPSCs have been grown on feeder cells in four different media, including ENHSM (18), 5iLA (19), T2iG6Y (20) and LCDM (21), that have been shown to reprogram human PSC toward the naïve state of pluripotency. All of them are based on the activation or inhibition of the signaling pathways involved in primed and naïve pluripotency (Table 1).

| Medium (reference) | ENHSM (18) | 5iLA (19) | T2iG6Y (20) | LCDM (21) |
|----------------------------------|------------|-----------|-------------|-----------|
| Epigenetic modifiers | | | HDACi | |
| Growth factors | hLIF | hLIF | hLIF | hLIF |
| | Activin A | Activin A | | |
| | Vitamin C | | Vitamin C | |
| Inhibitors of signaling pathways | GSK3βi | GSK3βi | GSK3βi | GSK3βi |
| | MEKi | MEKi | MEKi | |
| | P38i | | | |
| | JNKi | | | |
| | PKCi | | PKCi | |
| | AXINi | | | AXINi |
| | ROCKi | ROCKi | ROCKi | ROCKi |
| | SRCi | SRCi | | |
| | RAFi | | | |
| Others | | | | DiM |
| | | | | MiH |

Table 1: Composition of media used for human iPSC reversion toward the naïve state of pluripotency.

Results and Discussion

To be useful for biodiversity preservation, somatic tissues have to be easily available for sampling, even on field-raised animals and on diseased or dead individuals, and cryobanking without the need for prior cell isolation. We selected ear biopsies that meet these requirements and determined their cryopreservation conditions by testing five parameters: (i) possible retention of the samples at 4°C for 48 h before cryobanking, (ii) tissues from biopsies (skin versus internal cartilage), (iii) the size of frozen tissue pieces (3 mm² versus 1 cm²), (iv) freezing medium, synthetic (CRYO3) versus biological (FBS), to eliminate any biological hazard, and (v) percentage (4% versus 10%) of the cryoprotective agent (DMSO) to avoid toxic risk. All conditions were tested with four separate samples from four different rabbits, by comparing the time required for deriving fibroblasts from frozen tissues to that required for cartilage samples and epithelial cells are obtained from skin pieces (Figure 3A). However, most of the freezing conditions resulted in primary cells, with the exception of large pieces of skin or cartilage, from biopsies held for 48 h at 4°C. We observed small variations in the time taken to obtain confluent primary cultures, but these differences are only statistically significant between fresh and frozen samples. Nevertheless, after the first cell passage, no change in the growth rate could be identified (Figure 3B). Moreover, once fibroblastic or epithelial cells had been derived, cryopreserved, and thawed to produce iPSCs, no difference in viability and growth rates was observed. Likewise, cell transduction rates with the Sendai fluorescent reporter vector were more related to the sensitivity to infection of each rabbit used than to the cryopreservation conditions (data not shown) (22). Therefore, we have defined a standardized freezing protocol for skin or cartilage of the ear for CRB-Anim cryobanking as follows: ear biopsies can be treated after a maximum storage of 48 h at 4°C in PBS-PSG; the 3-mm² pieces of the selected

dissected tissue are then frozen in CRYO3 + 4% DMSO in a freezer with a temperature-controlled decrease of 1°C/min until -80°C and stored in liquid nitrogen.

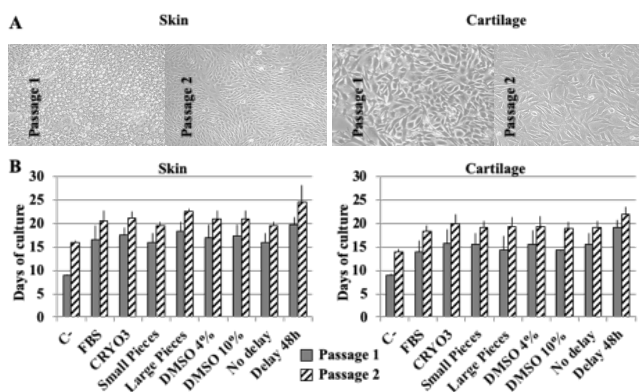


Figure 3: Effect of tissue cryopreservation conditions on cell derivation: (A) morphology of cells, (B) duration of derivation; C- = fresh tissue as negative control; conditions tested: tissue (skin vs cartilage), medium (FBS vs CRYO3), size of tissue pieces (small vs large), concentration of DMSO (4% vs 10%), and delay between sampling and treatment of samples (0 h vs 48 h at 4°C).

Until now, the reprogramming technique used in rabbits has led to the modification of the iPSC genome because retroviral vectors have the property of being integrated into the DNA of transduced cells. However, the iPSC genome should not be altered for the use in species preservation. The reprogramming of PBMCs with Sendai viral vectors is the most common non-integrative method used to produce human iPSCs. These viral vectors produce hemagglutinin that allows non-adhering PBMCs to plate into culture dishes after transduction, and, thus, easily select potentially reprogrammed cells. Therefore, we tested this technique with rabbit fibroblasts using human and rabbit PBMCs as controls. We first compared cell transduction rates with the Sendai fluorescent reporter vector and observed a higher percentage for fibroblasts (25%-70%) than for PBMCs (0.3%-8%) (Figure 4A). However, after transduction of rabbit cells with Sendai viral vectors expressing human *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* and *c-MYC* genes, we were unable to obtain rabbit iPSC lines from fibroblasts as from PBMCs, whereas several human iPSC lines were derived (Figure 4B). Three reasons may explain these negative results: (i) the transduction rate was too low for rabbit PBMCs, (ii) the adhesion advantage of transduced PBMCs was not useful in selecting potentially reprogrammed fibroblasts, and (iii) the high growth of rabbit fibroblasts precluded the emergence and development of iPSC colonies. The search for an efficient non-integrative method for producing rabbit iPSCs is still ongoing.

Regardless of the reproductive biotechnology used to transmit their genetic inheritance, iPSCs must self-renew in the naïve state of pluripotency to be useful for the conservation of biodiversity. Like all non-rodent mammal cells, rabbit iPSCs are only obtained in the primed state of pluripotency and must be reprogrammed toward the naïve state without alteration of their genome. To this end, we tested four different culture media that have been shown to give rise to so-called human naïve PSCs, even if these cells

do not display all the characteristics of the naïve pluripotency described in mice. We applied these culture conditions to rabbit iPSCs as described by the authors of the corresponding publications (Table 1; Figure 5) or by gradually changing the culture medium or even with certain variations in the concentration of some components of these media. Nevertheless, we were not able to get the reversion of rabbit iPSCs, which stopped growing and started to differentiate quickly. These data demonstrate that the signaling pathways sustaining naïve pluripotency in rabbit PSCs are slightly different from those of their primate counterparts. A more systematic analysis of these signaling pathways in rabbit embryos is required to better characterize the pluripotency mechanisms of this species and efficiently reprogram iPSCs toward the naïve state.

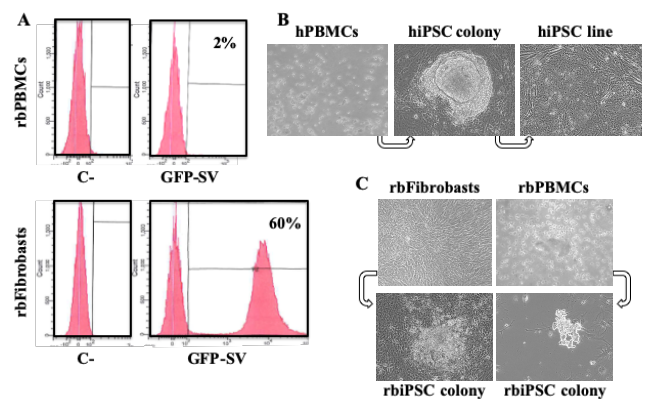


Figure 4: Production of iPSC lines by transduction of PBMCs or fibroblasts with Sendai viral vectors: (A) cytometry analysis of cell transduction rates with GFP-expressing Sendai reporter vector, (B) derivation of human iPSCs from PBMCs transduced with Sendai viral vectors carrying *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* and *c-MYC* genes, (C) rabbit iPSC clones obtained after transduction of fibroblasts or PBMCs with the same reprogramming Sendai vectors

In conclusion, iPSCs are promising tools not only for the preservation of biodiversity, but also for the creation of bioreactors or animal models of human diseases through transgenesis. For these purposes, the rabbit is a good model of all mammals because of its breeding advantages, its genetic and physiological proximity to primates, and its embryologic development features (23). In addition, the rabbit is the only livestock species from which ESCs and iPSCs have already been produced. Nevertheless, rabbit PSCs cannot be used in their current status; therefore, the understanding of their pluripotency mechanisms and reprogramming methods must be improved before biotechnologies using rabbit PSCs can be developed.

Acknowledgements

The present work was supported by research grants from the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR) (Oryctogene n°ANR-12-RPIB-0013), “Infrastructure Nationale en Biologie et Santé” (Ingestem n°ANR-11-INBS-0009), “Infrastructure Nationale en Biologie et Santé” (CRB-Anim n° ANR-11-INBS-0003), “LabEx” (Revive n°ANR-10-LABX-73), and “LabEx” (Devwecan n°ANR-10-LABX-0061).

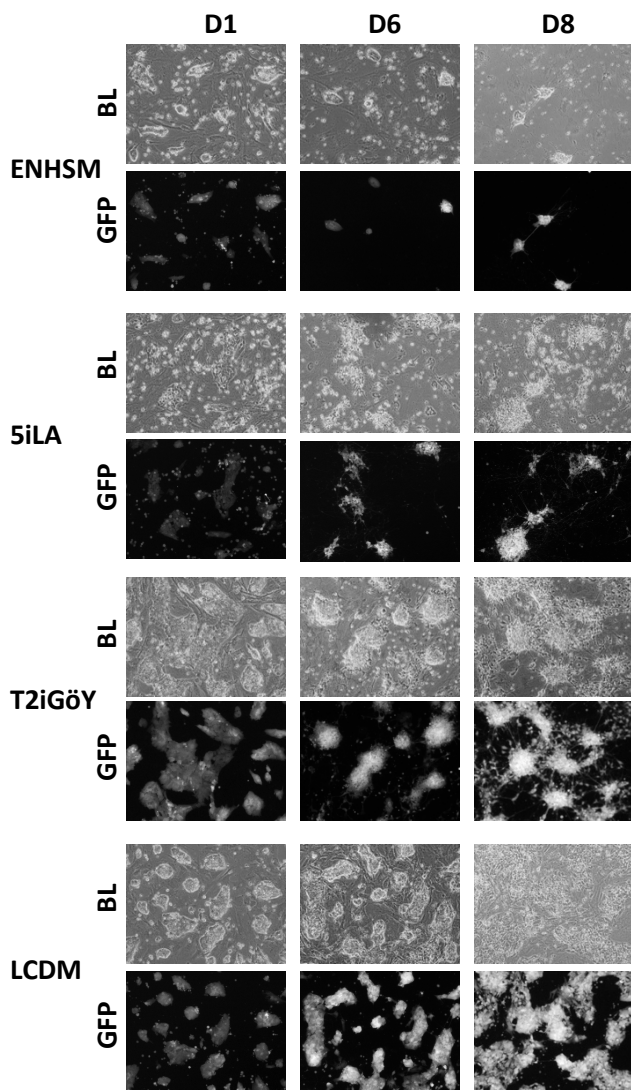


Figure 5: Effect of human reprogramming media (ENHSM, 5iLA, T2iGöY, and LCDM) on GFP-expressing rabbit iPSCs after 1, 6 and 8 days (D1, D6 and D8) of culture on feeder cells; BL= Bright Light; GFP= Green Fluorescent Protein expression.

References

1. FAO Agriculture Series N°38, 2007. ISSN 0081-4539.
2. <https://crb-anim.fr/access-to-collection/#/>
3. Takahashi & Yamanaka, 2006. *Cell*. 157:1254-1269.
4. Evans & Kaufman, 1981. *Nature*. 292:154-156.
5. Bradley et al., 1984. *Nature*. 309:255-256.
6. Henh et al., 2013. *Biochem. & Biophys. Res. Com.* 433:286-291.
7. Hayashi & Saitou, 2012. *Nat. Proto.* 8:1513-1524.
8. Wilmut et al., 1987. *Nature*. 385:810-813
9. Honda et al., 2010. *J. Biol. Chem.* 285:31362-31369.
10. Osteil et al., 2013. *Biol. Open*. 2:613-628.
11. Afanassieff et al., 2014. *Meth. Mol. Biol.* DOI 10.1007/7651_2014_140.
12. Nichols & Smith, 2009. *Cell Stem Cell*. 4:487-492.
13. Savatier et al., 2017. *Stem Cell Res.* 19:104-112.
14. Guo et al., 2009. *Development*. 136:1063-1069.
15. Chen et al., 2015. *Nat. Comm.* 6:7095-7112.
16. Taponnier et al., 2017. *Stem Cell Res.* 24:116-117.
17. Mangeot et al., 2002. *Mol. Ther.* 5:283-290.
18. Gafni et al., 2013. *Nature*. 504:7479-7483.
19. Theunissen et al., 2014. *Cell Stem Cell*. 15:471-487.
20. Takashima et al., 2014. *Cell*. 157:1254-1269.
21. Yang et al., 2017. *Cell*. 169:243-257.
22. Gavin-Plage et al., 2019. Submitted to *Int. J. Mol. Sci.*
23. Duranthon et al., 2012. *Transgenic Res.* 21:699-713.

RÉSUMÉ

DERIVATION DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES A PARTIR DE LIGNEES DE LAPINS TRANSGENIQUES POUR LE GENE *hSTAT3-ERT2*

L'obtention de cellules souches embryonnaires (ESC) chez le lapin permettrait de développer des techniques de transfert de gènes et de créer des animaux transgéniques modèles de maladies humaines. En effet, le lapin est physiologiquement et génétiquement plus apparenté aux primates que ne l'est la souris et présente de nombreux avantages tels que sa facilité et son faible coût d'élevage, sa taille moyenne, sa prolificité, son intervalle de génération court et sa forte production embryonnaire. Pendant longtemps, le lapin a été une espèce réfractaire à la dérivation des ESC. En effet la dérivation de lignées d'ESC repose sur la capture et la stabilisation *in vitro* de l'état de pluripotence des cellules du bouton embryonnaire d'un embryon au stade blastocyste. La difficulté réside donc dans la définition des conditions de culture permettant de maintenir cet état de pluripotence des cellules embryonnaires. Depuis 2006, différents groupes ont publié l'obtention d'ESC de lapin, mais les différentes lignées rapportées sont dépendantes du FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) et de l'activine et sont incapables de créer des chimères somatiques et germinales. Ces cellules sont dites dans l'état amorcé de pluripotence, état qui s'oppose à l'état naïf représenté par les ESC de rongeur qui se multiplient en présence de LIF (Leukemia Inhibitory Factor) et de BMP4 (Bone Morphogenic Protein 4) et qui sont à l'origine du développement et de l'utilisation de lignées de souris transgéniques en biologie.

Toutes les données actuelles montrent que seules les cellules à l'état naïf peuvent produire des embryons chimériques et la plupart des recherches sur les ESC non-murines sont orientées vers la production de cellules à l'état naïf. Ainsi, la surexpression de différentes combinaisons de facteurs de pluripotence, tels que Oct4, Sox2, Klf2, Nanog et Klf4, a permis d'améliorer l'état de pluripotence des ESC humaines. Dans mon laboratoire d'accueil, la reprogrammation des ESC humaines à l'état naïf a été obtenue par la surexpression d'une forme hormono-dépendante du facteur Stat3 murin. Stat3 est un facteur de signalisation et de transcription qui joue un rôle clé dans le maintien de l'état naïf de pluripotence des ESC murines. Il transfère le signal induit par le LIF jusqu'au noyau de pluripotence composé des trois gènes *Oct4*, *Sox2* et *Nanog*. Ainsi l'activation par le tamoxifène de la forme hormono-dépendante de Stat3, mStat3-ER^{T2}, a permis d'activer la voie LIF/Stat3 dans les ESC humaines et de les rendre indépendantes du FGF2. Afin d'évaluer si un même effet pourrait être obtenu chez le lapin, mon laboratoire d'accueil a créé deux lignées de lapins transgéniques exprimant la protéine humaine STAT3-ER^{T2}. Le but de mon projet d'EPHE a donc été d'évaluer le rôle de Stat3 dans la pluripotence chez le lapin à l'aide de ces lignées transgéniques. Pour cela mon travail a été divisé en 3 parties : 1) la caractérisation et l'entretien des lignées de lapins transgéniques ; 2) la dérivation de lignées d'ESC à partir d'embryons transgéniques ; et 3) l'analyse de l'effet de différents facteurs de croissance sur les embryons transgéniques.

Les résultats obtenus montrent d'une part une instabilité inattendue de l'expression du transgène dans les embryons, d'autre part l'absence d'effet de l'activation du facteur hSTAT3-ER^{T2} dans l'état de pluripotence des ESC dérivées et enfin le manque d'action sur les embryons transgéniques, des facteurs de croissance classiquement utilisés chez les primates pour améliorer l'état de pluripotence des cellules. L'ensemble de ces résultats soutient l'hypothèse que, les voies de signalisation qui activent les mécanismes de maintenance de la pluripotence *in vivo* comme *in vitro* diffèrent d'une espèce à l'autre, même si les gènes engagés dans ce phénomène sont très conservés. Il semble donc nécessaire d'étudier les voies de signalisation et les gènes impliqués dans la pluripotence *in vivo* dans l'embryon de lapin, afin de pouvoir appliquer ces informations à la dérivation d'ESC à l'état naïf chez cette espèce.

Mots clés : Cellules souches embryonnaires ; Pluripotence ; Transgénèse ; Lapin ; Stat3.