

Étude de la pluripotence des cellules souches embryonnaires chez le lapin

Pierre Osteil

▶ **To cite this version:**

Pierre Osteil. Étude de la pluripotence des cellules souches embryonnaires chez le lapin. Sciences du Vivant [q-bio]. UCBL Lyon 1, 2025. Français. ⟨NNT : ⟩. ⟨tel-05189646⟩

HAL Id: tel-05189646

https://hal.science/tel-05189646v1

Submitted on 28 Jul 2025

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.



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC 4.0 - Attribution - Non-commercial use - International License

Université Claude Bernard Lyon 1

UNIVERSITÉ DE LYON

N° d'ordre 301 - 2013 Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE
EDISS

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 16 Décembre 2013
par
M. OSTEIL Pierre

TITRE :

Etude de la pluripotence des cellules souches embryonnaires chez le lapin

Directeur de thèse : Dr. JOLY Thierry

JURY:
Prof. DERRINGTON Edmund (Président du jury)
Dr. SAVATIER Pierre (Examinateur)
Dr. JOUNEAU Alice (Rapporteur)
Dr. DE VOS John (Rapporteur)
Dr. ABERDAM Daniel (Rapporteur)

Thèse préparé à :
INSERM Unité 846
Institut Cellules Souches et Cerveau (CSC)
Stem cells and Brain Research Institute (SBRI)
18 Avenue du doyen Lépine 69500 BRON

Remerciements

Merci à Henry Kennedy et Colette Dehay pour m'avoir accepté tant d'années dans votre unité.

Merci à mes rapporteurs, Dr. Alice Jouneau, Dr. John De Vos et Dr. Daniel Aberdam pour avoir accepté d'évaluer mon travail de doctorat.

Merci au Prof. Edmund Derrington, pour avoir accepté si rapidement le rôle de président de mon jury de soutenance.

Je souhaiterais remercier mon directeur d'équipe, Pierre Savatier. Je ne sais pas vraiment de quelle manière je pourrais t'exprimer ma gratitude. Depuis le début tu as placé en moi une confiance au-delà de mes espérances. Lorsque je suis arrivé dans l'antre de l'Inserm U846, en septembre 2007, je n'avais pas d'expérience de labo. Ma formation en IUT m'a appris ce qu'étais la démarche expérimentale mais pour le reste j'étais un novice. Je n'avais encore jamais mis les bras sous une hotte de culture ! Et tu m'as accepté tout de même. J'espère avoir été à la hauteur, en tout cas pour ma part, 6 ans après, je me sens grandi de cette expérience. Et je te dois la plus grande partie de mon évolution. Tu as toujours été à l'écoute professionnellement et personnellement. Je me souviendrais, surement toute ma vie, de notre petite virée en Chine. Ce voyage m'a beaucoup appris. Je voulais aussi te remercier pour tous les congrès auxquels j'ai pu participer (Cardiff, Budapest et Boston). Tu m'as inoculé le virus du voyage. Avant l'Inserm, je n'avais jamais été aussi loin ! Je te remercie encore pour m'avoir fait confiance pour la thèse. Après l'EPHE, je ne savais pas vraiment si j'en étais capable. Je réalise maintenant, après l'écriture de ce manuscrit, que ce n'était pas la même paire de manche. Mon expérience scientifique a été façonnée dans ton équipe et pour cela je te serais toujours redevable. Merci et encore merci !

Ensuite je voudrais remercier mon directeur de thèse Thierry Joly. Merci de m'avoir encadré ces trois dernières années. Pour être toujours disponible pour les manips, pour tous les embryons que tu m'as confiés, et pour la confiance que tu m'as également accordée. Sans toi, tout ce projet n'aurait pas pu voir le jour. Merci aussi pour ta bonne humeur et ton franc-parlé qui resteront, pour moi, inoubliables.

Merci également à ma co-encadrante, Marielle Afanassieff. J'espère que les personnes qui lisent ces mots me comprendront quand je dis que tu es et que tu resteras ma « maman du labo » ! Un énorme merci pour tout ce que tu as fait pour moi, et je ne parle pas seulement de la correction de ce manuscrit. Merci aussi pour la confiance aveugle que tu as placé en moi. Je sais que sans toi je ne serais pas en train d'écrire ces mots. Merci pour ta patience (il en fallait avec quelqu'un comme moi) et ton honnêteté. Ces 6 ans avec toi m'ont paru presque trop courts. Cela a vraiment été un plaisir de travailler avec toi.

Merci à mes co-thésards ! Yann, tout d'abord, mon collègue et ami « lapin ». Merci pour toutes nos discussions et débats sans fin, nos soirées hydratées, nos moments prises de chou dans le P2 et aussi pour ta gentillesse et ton amitié. Au début, entre nous, ce n'était pas la panacée mais j'ai compris que tu étais quelqu'un de bien et d'honnête. Je me souviendrais toute ma vie de notre première nuit à Tours. Mémorable (encore une petit merci à Marielle !!). Mais également de notre première fois aux Amériques, de cet arrêt de bus, et aussi de ton épique déménagement.

Merci pour tous ces moments gravés dans ma mémoire. Je te souhaite bonne chance pour la fin de ta thèse et du bonheur avec Anne-Lise à qui je souhaite bon courage pour le 20 !!.
Mon Vince, merci à toi aussi pour ta simplicité, ton amitié et ta bonne humeur. J'ai franchement passé d'excellents moments en ta compagnie. Merci pour cet été en Corse. J'espère que ton projet professionnel fonctionnera et que tu t'épanouiras à faire découvrir la science aux petits et aux grands. Bonne chance pour le 18 !!
En tout cas merci à tous les deux, mes petits barbus, pour tous les moments qu'on a passé ensemble, j'espère qu'on ne se perdra pas de vue, et qu'on gardera cette complicité. Vous êtes devenus de véritables amis, des potes de galère comme de moments plus heureux.

Merci à Pierre-Yves pour toutes nos franches rigolades et pour ton regard d'expert. J'ai vraiment beaucoup appris en t'écoutant. Tu fais partie des personnes qui ont compté dans ma (jeune) vie de scientifique.

Merci à toi, la grande Sophie, pour ta bonne humeur et tous les instants qu'on a partagé que je n'oublierais pas. Toi aussi tu es là depuis le début et si tu avais dit oui il y a 3 ans je ne serais pas là aujourd'hui (je parle de la thèse bien sûr). Ca non plus je ne l'oublierais pas.

Merci aussi à toute l'équipe de Pierre, à savoir, Anaïs, étudiante EPHE. J'espère avoir été un bon encadrant pour ton stage. Merci pour ta motivation et ta bonne humeur. Aussi pour tout ce que tu as fait, car je te dois une partie des résultats de ce manuscrit. Merci à Fabrice, nouveau thésard. Tous les deux, mes colocataires de bureau, merci pour les bons moments passés ensemble. Merci à Maxime pour tout ce que tu fais pour les projets lapins. Merci à Magali, pour tout ce que tu fais pour nous. Je n'ai pas toujours répondu présent à tes appels mais sache que je me rattraperais ! Merci à toi Edwige (et à Grignotte que tu embrasseras pour moi!). Merci à HongWei. Je me souviendrais longtemps de notre virée à Boston. Merci à Florence pour tous tes conseils lorsque je dérivais la lignée humaine. C'était rassurant d'avoir ton expérience à disposition.
Merci aux anciens. Tout d'abord à ma Suzy ! Mon ancienne colocataire de bureau. Merci à toi de m'avoir tant appris. Je garde précieusement en mémoire toutes nos discussions privées dans le bureau. Diana, je voulais te remercier pour tous les moments qu'on a partagés au labo et en dehors. Je te souhaite plein de bonheur avec Stéphane. Merci à Aga pour tout ce que tu m'as appris au labo et en Chine. Merci à Virginie pour nos footings où je me suis senti ridicule et plus sérieusement pour tout ce qu'on a partagé. Merci aux anciens-nouveaux. Je pense à Irène et Guillaume qui m'ont connu au tout début et qui sont récemment rentré de Singapour. Merci à tous les deux. Guillaume je n'oublierais pas tous les conseils que tu m'as donnés quand j'ai commencé à travailler sur les cellules humaines et en tant qu'EPHE. Irène, merci aussi pour tes conseils, pour ta bonne humeur et tes bruits de talons qui me manquaient. En tout cas je suis très content de vous retrouver. Je vous souhaite plein de bonheur avec votre petite Elana. Egalement Claire, ma petite EPHE, qui est maintenant dans sa cabane au Canada. Bonne chance pour la thèse. Merci à Estelle, à qui je dois aussi une partie des résultats sur les lignées ALF. Merci également à Murielle pour les manips lapin.

Merci à Bertrand Pain et son équipe. De bons moments et un réel enrichissement professionnel que d'avoir parmi nous une telle équipe. Merci donc à tous les poulets, Pauline, Christian, Aurélie, Franca, Clément M. et Cécile.

Merci aussi aux membres des autres équipes de l'unité. Je pense qu'il sera difficile de retrouver une ambiance pareille dans d'autres labos.

Merci à Jean-Marie Exbrayat, mon directeur pédagogique à l'EPHE, qui a été le premier à évoquer la possibilité pour moi de faire une thèse.

Merci à tous nos collaborateurs. Tout d'abord ceux de Jouy-en-Josas, Véronique Duranthon, Barbara Panneau, Nathalie Daniel et Luc Jouneau. Puis ceux de Gödöllö, Szuszanna Bösze, Elen Gocza, Andràs Dinnyès et Pouneh Maraghechi. Merci à la plateforme Genotoul et aux personnes qui m'ont aidé dans l'analyse des données de single cell qPCR, Clémence Genthon et Hervé Acloque.

D'un point de vue plus personnel j'aimerais remercier mes parents. Tous les deux vous m'avez toujours fait une confiance aveugle et vous m'avez toujours soutenu moralement et financièrement. Je ne pense pas un jour pouvoir vous rendre tout ce que je vous dois mais en tout cas je vous aime et merci. Merci à ma frangine, Paupau, et son poster qui orne la porte de mon bureau. Merci à toi pour tous nos bons moments. Merci à toute ma famille.
Merci aussi à toute ma bande de glinches : Calus, Juju, Caldo, Chichi, Millette, Vince, Bierro, Fredo, Popol, Yoyo, Caros (grande et petite), Ludo et Fils. Sans vous je pense que l'aventure n'aurait pas été aussi belle.

Merci à Crock et Grignette.

Pour terminer, parce que je gardais le meilleur pour la fin, merci à Pauline, ma chérie. Merci pour toute ta patience quand je passais mes week-ends au labo et quand j'ai écrit ce manuscrit. Je me rattraperais quand tout cela sera terminé, promis ! Merci pour tout ce que tu fais et tout ce que tu es pour moi. J'espère qu'on vivra encore plein de belles choses ensemble. Je te dois une grande partie de ce que j'ai accompli. Merci.

En tout cas, un grand merci à tous pour ces 6 dernières années. Je garderais ces moments précieusement (et jalousement) dans ma mémoire.

Merci.

Table des matières

Table des illustrations **3**

Liste des abréviations **5**

1 INTRODUCTION **8**

1.1 Le développement embryonnaire **10**

1.1.1 Les grandes étapes du développement embryonnaire précoce 10

1.1.2 Totipotence versus pluripotence 11

1.1.3 Les différences entre mammifères 13

1.1.4 La diapause 15

1.2 Les cellules souches pluripotentes de souris **17**

1.2.1 Les cellules souches embryonnaires : ESCs 17

1.2.2 Les cellules souches embryonnaires issues d'embryons clonés : ntESCs 21

1.2.3 Les cellules souches pluripotentes induites : iPSCs 22

1.2.4 Les cellules souches de l'épiblaste : EpiSCs 25

1.2.5 Les cellules souches adultes 25

1.2.6 Importance des cellules souches pluripotentes en transgénèse 27

1.3 Les cellules pluripotentes chez les autres mammifères **29**

1.3.1 Les cellules pluripotentes simiennes 29

1.3.2 Les cellules pluripotentes humaines 30

1.3.3 Les cellules pluripotentes de lapin 31

1.3.4 Les cellules pluripotentes chez les autres espèces 32

1.4 Les mécanismes moléculaires de la pluripotence **32**

1.4.1 Le noyau de pluripotence 32

1.4.2 Les voies de signalisation de la pluripotence 38

1.5 Les différents niveaux de pluripotence **48**

1.5.1 Les ESCs naïves versus amorcées 48

1.5.2 L'état fondamental de pluripotence 52

1.6 Les caractéristiques principales des cellules pluripotentes naïves et amorcées **56**

1.6.1 La culture des PSCs 56

1.6.2 Le cycle cellulaire 59

1.6.3 Les microARNs 65

1.6.4 Les marques épigénétiques 68

1.7 Projet de doctorat 75

2 RESULTATS 78

2.1 Les rbPSC-FGF 79

2.1.1 La dérivation 79

2.1.2 La comparaison des rbESCs et des rbiPSCs dépendantes du FGF2 81

ARTICLE N°1: INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS DERIVED FROM RABBITS EXHIBIT SOME CHARACTERISTICS OF NAÏVE PLURIPOTENCY 85

2.2 La dérivation de lignées rbESC-LIF 116

2.2.1 Dérivation de lignées en absence de FGF 116

2.2.2 Caractérisation des lignées rbESC-LIF 118

2.3 Comparaison moléculaire des lignées rbESC-FGF, rbiPSC-FGF, et rbESC-LIF 121

2.3.1 Analyses des transcriptome sur puces Agilent 123

2.3.2 Les microARN 127

2.4 La dérivation de lignées en condition 2i/LIF 129

2.5 Dérivation de lignée par passage unicellulaire 131

2.5.1 Adaptations des lignées rbESC-LIF 131

2.5.2 Dérivation et caractérisation des lignées rbESC-ALF 135

2.5.3 Caractérisation moléculaire des rbESC-ALF 140

2.5.4 Stabilité génétique des lignées rbESC-ALF 142

2.5.5 Production de chimères avec les lignées rbESC-ALF 144

2.6 Le rôle du LIF 146

2.6.1 Le rôle du LIF dans la dérivation 146

2.6.2 Le rôle du LIF dans les lignées stabilisées. 151

2.6.3 Culture des lignées rbESC-ALF sans MEF 161

3 DISCUSSION 163

3.1 La dérivation de rbESCs dépendantes du FGF2 163

3.2 La stabilisation de lignées indépendantes du FGF 164

3.3 L'instabilité génétique des lignées rbESC-ALF 165

3.4 Les caractéristiques naïves des rbESC-ALF 166

3.5 Le rôle du LIF dans la dérivation des lignées rbESC-ALF 166

3.6 Le rôle du LIF dans le contrôle de la pluripotence des lignées rbESC-ALF 167

3.7 Perspectives 168

4 BIBLIOGRAPHIE 172

5 ANNEXES 193

ARTICLE N°2: GENERATION OF RABBIT PLURIPOTENT STEM CELL LINES.....196

Table des illustrations

Figure 1: Le développement embryonnaire précoce 9
Figure 2: Les différences de développement embryonnaire entres espèces..... 12
Figure 3: Les différences dans le développement embryonnaire précoce..... 14
Figure 4: Implantation de l'embryon de souris dans l'utérus..... 16
Figure 5: Les 3 propriétés fondamentales des cellules souches embryonnaires 18
Figure 6: Obtention de ntESC à partir d'un noyau de fibroblaste..... 20
Figure 7: Obtention de lignées d'EpiSC de souris 24
Figure 8: Les différentes méthodes pour l'obtention d'animaux transgéniques 26
Figure 9: Les voies de signalisation du LIF 37
Figure 10: La voie de signalisation Wnt/βCatenin..... 41
Figure 11: Les voies de signalisation du BMP4..... 43
Figure 12: Les voies de signalisation FGF et TGFb/Activine/Nodal..... 45
Figure 13: Les différents niveaux de pluripotence..... 47
Figure 14: Les voies de signalisation impliquées dans le maintien de la pluripotence..... 49
Figure 15: La condition 2i/LIF..... 51
Figure 16: Le cycle cellulaire..... 60
Figure 17: Analyse du cycle cellulaire..... 62
Figure 18: Processus de maturation des microARNs..... 64
Figure 19: Régulation de la XCI dans les mESCs 70
Figure 20: Structure du vecteur EOS 73
Figure 21: Révélation de l'expression de la protéine GFP..... 80

Figure 22: Caractérisation des lignées rbES-LIF1 et 2 117
Figure 23: Voies de signalisations impliquées dans le maintien des rbESC-LIF 119
Figure 24: Analyse du transcritpome des rbPSC et de l'embryon de lapin sur puces Agilent (1) 122
Figure 25: Analyse du transcriptome des rbPSC et de l'embryon de lapin sur puces Agilent (2) 124
Figure 26: Analyse de l'expression des clusters de miARNs des rbPSCs et des embryons de lapin (ΔΔCt) 126
Figure 27: Dérivation de lignée en condition 2i/LIF 128
Figure 28: Les cellules rbES-ALF1 et 2 132
Figure 29: Caractérisation des lignées rbESC-ALF 134
Figure 30: Inihibteurs des voies de signalisation 136
Figure 31: Effets de l'inhibition des voies de pluripotences sur les rbESCs ALF. 137
Figure 32: Comparaisons des 3 types de lignées 139
Figure 33: Stabilité des lignées rbESC-ALF 141
Figure 34: Injections des lignées de rbESC-ALF dans des embryons au stade 8 cellules 143
Figure 35: Analyses des lignées dans différent milieux (1) 145
Figure 36: Analyses des lignées dans différent milieux (2) 147
Figure 37: Courbe de dérivation en présence des inhibiteurs de JAK et d'ALK 149
Figure 38: Analyses comparatives des lignées rbESC-ALF, rbESC-AF et rbESC-LIF 152
Figure 39: Analyses comparatives des différentes lignées rbESC par rapport aux cellules de l'ICM 154
Figure 40: PCA représentant le transcriptome des lignées rbESC-ALF et rbESC-AF 156
Figure 41: Heatmap représentant les deux types de cellules en cluster de cellules et de gènes 158
Figure 42: PCA représentant des cultures des lignées rbES-ALF 4 et 8 en matrigel par rapport aux cellules de l'ICM 160
Figure 43: Photographie d'un puits (n°59) d'une plaque Fluidigm 193
Figure 44: Heatmap rbES-ALF48 194
Figure 45: Heatmap rbES-AF62 195

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALF	Accutase - LIF - FBS
ARN	Acide RiboNucléique
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
ButNa	Butyrate de Sodium
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxyde
dpc	day post coitum
EB	Embryoid Body ou Corps Embryoïdes
EC	Embryonic Carcinoma cells ou cellules de Carcinome Embryonnaire
EDTA	Ethylène Diamine Tetra Acétique
EGC	Embryonic Germ cells ou cellules souches Germinales
EGA	Embryo Genome Activation
EOS	Early Transposon promoter and *Oct4* and *Sox2* enhancers
EPI	Epiblaste
EpiSC	Epiblast Stem Cells ou cellules Souches Epiblastiques
ESC	Embryonic Stem cells ou cellules Souches Embryonnaires
FBS	Fœtal Bovine Serum ou Serum de Voeau Fœtal
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FIV	Fécondation *In Vitro*
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GFP	Green Fluorescent Protein
GMEM	Glasgow Modified Eagle Medium
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
hESC	Human Embryonic Stem cells ou cellules souches embryonnaires humaines
HPS	Hématoxyline-Phloxine-Safran
ICM	Inner Cell Mass ou Masse de cellules Internes ou bouton embryonnaire
IESC	Intermediate Embryonic Stem Cells
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
iPS	induced Pluripotent Stem cells ou cellules souches pluripotentes induites
ISARA	Institut Supérieur d'Agriculture Rhône-Alpes
KI	Knock-In
KO	Knock-Out
KO-DMEM	Knock-Out Dubelcco's Modified Eagle Medium
KO-SR	Knock-Out Serum Replacement
KP	Kenpaullone
LIF	Leukemia Inhibitor Factor
MEF	Mouse Embryonic fibroblast ou Fibroblaste Embryonnaire de Souris
mESC	Mouse Embryonic Stem cells ou cellules souches embryonnaires de souris

MM	Manteau Muqueux
MMC	Mytomycin C
NCS	New Calf Serum ou Serum de Veau Nouveau-né
NEAA	Non Essential Amino-Acid ou Acides aminés non essentiels
NT	Nuclear Transfer
ntESC	nuclear transfered Embryonic Stem cells ou cellules Souches Embryonnaires issus d'embryon cloné par transfert nucléaire
OF1	Oncins France 1
P	Passage
PA	Alcalin Phosphatase
pb	paire de base
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Primitive Endoderm
PGC	primordial Germ cells ou cellules germinales primordiales
PSC	Pluripotent Stem Cells
PSG	Penicilline Strepromycine Glutamine
rbESC	Rabbit Embryonic Stem cells ou cellules Souches Embryonnaires de lapin
rbiPSC	Rabbit induced Pluripotent Stem Cells
rhESC	rhesus monkey Embryonic Stem cells ou cellules Souches Embryonnaires de singe rhésus
RT	Room Temperature ou Température Ambiante
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency
TALEN	Transcription Activator-Like Effector Nuclease
TE	Trophectoderme
Xa	X chromosome activation
XCI	X Chromosome Inactivation
Xi	X chromosome inactivation
ZFN	Zinc Finger Nuclease
ZP	Zona Pellucida ou Zone Pellucide

INTRODUCTION

"Mon affaire est d'enseigner à mes aspirations
de se conformer aux faits, non d'essayer
d'harmoniser les faits avec mes aspirations »

Thomas H. Huxley (1825-1895)

1 Introduction

Les cellules souches pluripotentes (PSCs) sont des cellules présentant deux propriétés qui les distinguent de toutes les autres cellules somatiques : l'autorenouvellement et la pluripotence. L'autorenouvellement est leur capacité à se multiplier indéfiniment en culture *in vitro*, et la pluripotence est leur aptitude à se différencier dans tous les tissus qui forment un organisme adulte, y compris la lignée germinale. Mon travail de thèse a eu pour but d'obtenir et de caractériser la pluripotence d'une sous-catégorie de PSC, les cellules souches embryonnaires (ESCs), chez le lapin. L'utilisation de l'espèce lapin peut apparaître a priori originale et même incongrue, mais ce manuscrit a pour objectif de montrer que le lapin est un très bon modèle pour comprendre les mécanismes fondamentaux de la pluripotence chez les mammifères. De plus, nous verrons que les PSCs de lapin ont un intérêt non négligeable en recherche appliquée et en industrie pharmaceutique. Ainsi avant d'aborder mon travail sur les ESCs de lapin, je vais comparer tout au long de cette introduction bibliographique, les données connues dans le domaine des PSCs chez le lapin, les primates humains et non-humains et la souris, qui reste l'espèce de référence pour ces cellules. En exposant les différents types de PSCs, je présenterai les points communs et divergents chez ces espèces concernant le développement embryonnaire précoce, les niveaux de pluripotence, les mécanismes moléculaires soutenant la pluripotence et les caractéristiques des PSCs. Je terminerai par l'impact de l'espèce lapin dans le domaine des PSCs et par les objectifs de mon travail de thèse.

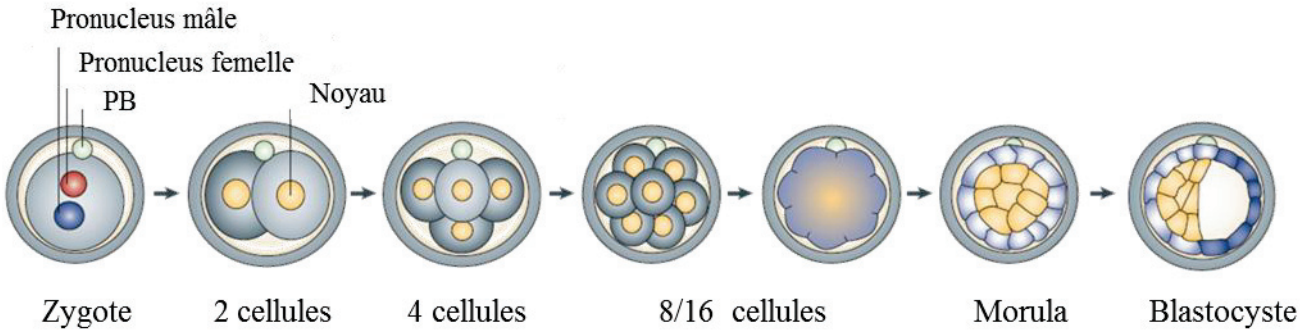


Figure 1: Le développement embryonnaire précoce

Les différentes phases du développement embryonnaire précoce après fusion des deux gamètes (1n chacun) il y a formation du zygote (2n), c'est-à-dire de la première cellule ou cellule œuf (Zernicka-Goetz, 2005)

PB pour Polar Body. En français, globule polaire résultant de la maturation de l'ovocyte

1.1 Le développement embryonnaire

1.1.1 Les grandes étapes du développement embryonnaire précoce

Les ESCs sont dérivées à partir d'embryon précoce au stade blastocyste, il est donc important, avant d'aborder le vaste domaine des ESCs de rappeler les premières étapes du développement embryonnaire. L'embryon nait de la rencontre de deux gamètes sexuels, un spermatozoïde et un ovocyte. Les noyaux des deux gamètes, appelés pronucleï, vont fusionner et former le noyau de la première cellule appelée « cellule œuf » ou zygote (Figure 1). Cette cellule va ensuite se diviser pour donner deux cellules filles identiques, qui vont elles-mêmes se diviser pour donner quatre cellules. Ce processus va se répéter jusqu'à atteindre le stade morula, nom latin de « mûre » car l'embryon ressemble à une mûre à ce stade du développement embryonnaire. La morula est caractérisée par la première spécialisation des cellules. En effet, elle est composée de deux types de cellule. La partie la plus externe formera le trophectoderme (TE) qui constitue une couche de cellules entourant le bouton embryonnaire ou la masse cellulaire interne (ICM). L'ICM est à l'origine de l'individu tandis que le TE est lui, à l'origine d'annexes embryonnaires telles que le placenta. Ces deux types de cellules ne sont observables qu'au stade suivant, c'est-à-dire au stade blastocyste. En effet, les cellules internes de la morula vont se compacter jusqu'à l'apparition d'une cavité, appelée blastocœle, délimitant l'ICM entouré du TE (Figure 1)

Depuis le stade « cellule œuf », les cellules sont protégées par une membrane appelée zone pellucide (ZP). A la différence des autres espèces, l'embryon de lapin présente en plus, autour de la ZP, une couche muqueuse, très épaisse, appelée manteau muqueux (MM), qui s'avère, comme la ZP, être nécessaire pour l'implantation de l'embryon de lapin (Adams, 1958). Cette couche, constituée essentiellement de glycoprotéines est formée durant la descente de l'embryon vers les cornes utérines. Les embryons au stade 2 cellules ont un MM très fin alors que son diamètre, au stade blastocyste, peut atteindre 3 fois celui de l'embryon.

À partir du stade blastocyste, l'embryon s'implante et les cellules se multiplient de manière intense tout en poursuivant leur spécialisation. Le moment de l'implantation varie selon les espèces, du stade blastocyste pour la souris (3.5 dpc) au stade gastrula pour le lapin (6.5dpc). La gastrulation suit le stade blastocyste. Les cellules de l'ICM vont se spécialiser en deux feuillets distincts: l'épiblaste (EPI) et l'hypoblaste ou endoderme primitifs (PE). L'EPI est à l'origine des cellules composant l'individu alors que le PE est à l'origine de la vésicule vitelline (ou membrane de Heuser) qui donnera ensuite l'amnios. L'EPI se spécialisera ensuite

dans les trois feuillets embryonnaires que sont le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme. En résumé, l'endoderme est à l'origine de tous les organes et des tissus composant le tube digestif ainsi que les glandes annexes comme le pancréas, le mésoderme est à l'origine du système sanguin et du squelette, tandis que l'ectoderme deviendra le système nerveux et la peau.

1.1.2 Totipotence versus pluripotence

La première fois où l'Homme a évoqué la notion de pluripotence remonte à l'an 600 avant Jésus Christ, en faisant allusion à un carcinome embryonnaire, c'est-à-dire à une tumeur composée de cellules malignes en constante prolifération et de cellules différenciées dans les trois lignages embryonnaires. En effet, le décryptage de la tablette cunéiforme de Nineveh, a dévoilé ce présage : « Lorsqu'une femme donne naissance à un enfant avec trois jambes, deux à leur position normale, attachées au corps, et une troisième entre celles-ci, alors le pays connaîtra une grande prospérité ». Cette phrase est la trace la plus ancienne que l'Homme possède sur les carcinomes embryonnaires, dans ce cas de type sacro-coccygienne (placés autour du sacrum et du coccyx). La plupart du temps, lors de développements embryonnaires anormaux, on observe plutôt des terato-carcinomes provenant de la dégénération d'ovaires ou de testicules. Ce sont alors les cellules germinales primordiales (PGCs) qui dégénèrent (Stevens, 1962). Pour la première fois dans la littérature scientifique, L.C. Stevens a donné le terme « cellules souches » aux cellules malignes de ces térato-carcinomes. La capacité de ces cellules souches à se différencier dans tous les types de cellules composant l'individu, sans organisation pré-établie, a été appelée pluripotence. (Kleinsmith and Pierce, 1964). Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, durant le développement embryonnaire, les cellules prolifèrent très rapidement et vont se spécialiser. Chez les mammifères les cellules de l'embryon aux stades précoces de développement sont dites « totipotentes ». C'est-à-dire qu'elles sont capables de se spécialiser dans tous les types de cellules composant un organisme. Cela comprend les annexes embryonnaires (le placenta et le trophoblaste) tout comme les cellules de l'individu. Cette propriété est conservée du stade cellule œuf jusqu'au stade morula. À ce stade, l'ICM va se spécialiser uniquement dans les cellules composant l'individu alors que les cellules du trophectoderme se différencieront en cellules composant les annexes embryonnaires. Les cellules composant l'ICM sont dites quant à elles « pluripotentes », puisqu'elles sont capables de donner des cellules de toutes les lignées embryonnaires.

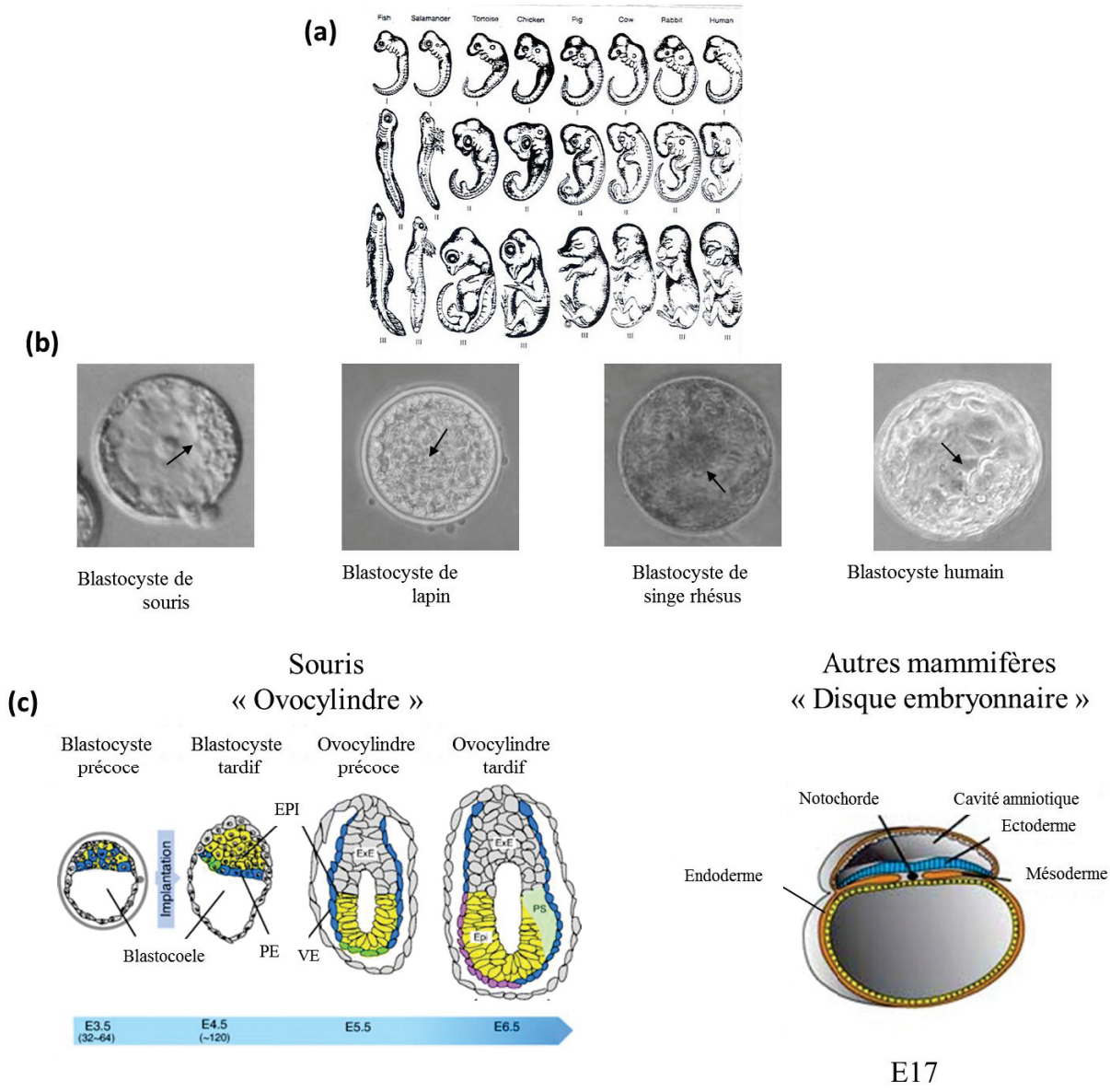


Figure 2: Les différences de développement embryonnaire entres espèces

(a) Développement embryonnaire tardif de différentes espèces allant du poisson à l'humain. Les différences de morphologie n'apparaissent pas avant le stade fœtal2.
Issu de « What evolution is? » de Ernst Mayr 2001.
(b) Blastocystes de différentes espèces de mammifères. La flèche noire indique la position de l'ICM.
(c) Comparaison des embryons au stade épiblaste de souris (ovocylindre – gauche (Takaoka and Hamada, 2012)) et les autres mammifères (disque embryonnaire - droite).
EPI : Epiblaste ; PrE : Endoderme primitif ; VE : Endoderme visceral ; PS : Ligne primitive

Lorsque les cellules sont engagées dans les trois feuillets embryonnaires, elles ne sont plus que « multipotentes », c'est-à-dire capables de se différencier en plusieurs types de cellules d'un même lignage donné, comme les cellules souches adultes hématopoïétiques. Enfin, lorsque les cellules sont au stade terminal de différenciation, elles ne se divisent qu'en un seul type de cellule, elles deviennent « unipotentes » comme les cellules du foie ou de la peau.

1.1.3 Les différences entre mammifères

1.1.3.1 Le développement embryonnaire

Bien que les modifications morphologiques durant le développement embryonnaire semblent globalement conservées entre les espèces et donc au cours de l'évolution (Figure2a), les chercheurs ont démontrés en fait l'existence de nombreuses différences et ce surtout au niveau moléculaire. Comme nous pouvons le voir sur la Figure2b les blastocystes des différentes espèces de mammifères se ressemblent. Les différences morphologiques semblent être inexistante du moins jusqu'au stade blastocyste (en omettant le fait que le lapin présente un MM avant son implantation). En revanche, lors de la spécialisation des cellules de l'ICM en cellules de l'épiblaste et de l'hypoblaste, le développement de l'embryon de souris s'avère unique. L'embryon va se développer en forme d'ovocylindre tandis que les embryons des autres mammifères vont prendre une forme de disque embryonnaire qui se développera sur le sac vitellin (Figure2c).

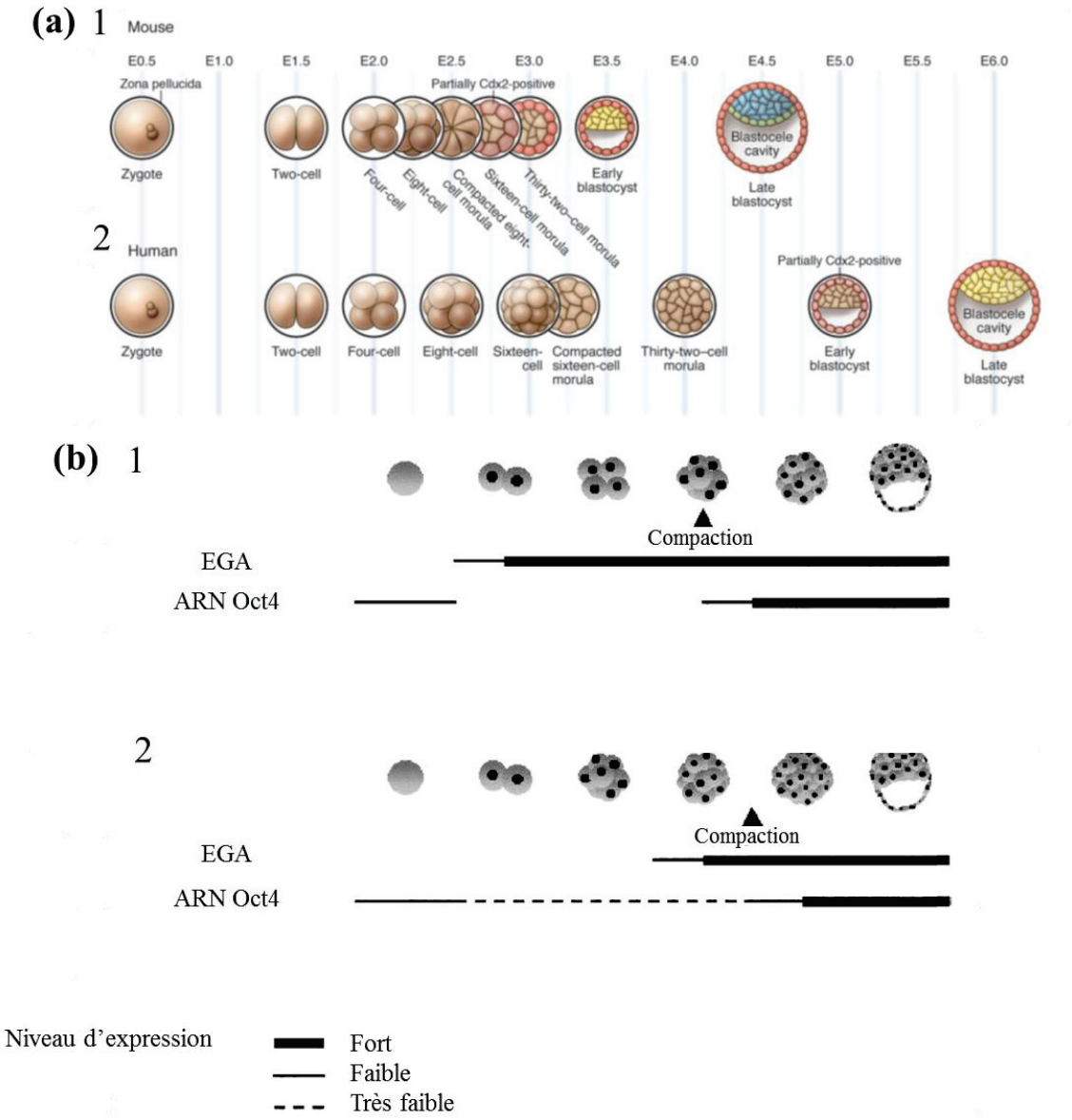


Figure 3: Les différences dans le développement embryonnaire précoce

(a) Comparaison entre un embryon de souris (A) et d'humain (B) au niveau des différentes étapes du développement embryonnaire précoce (Cockburn and Rossant, 2010)
(b) EGA entre la souris (1) et le boeuf (2). L'EGA est similaire au bœuf chez les mammifères autres que la souris (Kurosaka et al., 2004)

1.1.3.2 Le temps de développement et les différences moléculaires

Bien sûr, nous savons tous que le temps de gestation des mammifères varie entre espèces, chacune ayant sa propre stratégie qui sera la plus efficace et la moins coûteuse en énergie. Le temps de gestation chez la souris est court, elle met bas 21 jours après la fécondation de l'ovocyte. Pour l'Homme il s'agit de 9 mois, pour le singe autour de 8 mois selon les espèces, tandis que le lapin a un temps de gestation de 31 jours. Pour les embryons de mammifère (ainsi que dans tous les autres organismes animaux), les premières étapes du développement sont les mêmes (voir paragraphe 1.1), seules des différences dans l'échelle de temps ont été observées. La Figure 3a montre que la compaction de l'embryon débute au stade 8 cellules chez la souris tandis qu'elle apparaît au stade 16 cellules dans l'embryon humain (Edwards et al., 1981; Steptoe et al., 1971). De plus, pour atteindre le stade blastocyste l'embryon de souris nécessite 4,5 jours contre 6 jours pour l'embryon humain. L'espèce lapin a besoin d'un temps similaire à celui de la souris. Une autre étape critique présente des dissimilitudes selon les espèces. Il s'agit de l'activation du génome de l'embryon (EGA). Chez la souris, le zygote active son génome, c'est-à-dire qu'il débute la transcription de ses propres ARNs pour fabriquer les protéines nécessaires à son futur développement, très tôt, au stade 2 cellules. Chez le lapin (ainsi que pour l'homme) cette activation apparait au stade 16 cellules (Figure 3b). Contrairement à la souris, il s'avère que chez la majorité des mammifères – dont l'Homme - l'EGA est mise en place progressivement et qu'elle se termine au stade précédant la première différenciation des cellules (stade morula) (Léandri et al., 2009).

1.1.4 La diapause

Nous sommes tous familiers à l'idée que chez la femme, une grossesse moyenne dure environ neuf mois. Mais chez plus de 100 espèces de mammifères, on observe des différences de temps de développement de l'embryon au sein d'une même espèce, tout comme chez un même individu pour différentes gestations (Hondo and Stewart, 2005). Plusieurs stratégies ont été mises en place au cours de l'évolution afin de réguler la durée de gestation, comme par exemple le stockage et la rétention de sperme après l'accouplement, ou encore le ralentissement du développement de l'embryon implanté comme chez certaines espèce de chauve-souris. Mais la stratégie la plus commune semble être de stopper le développement de l'embryon avant

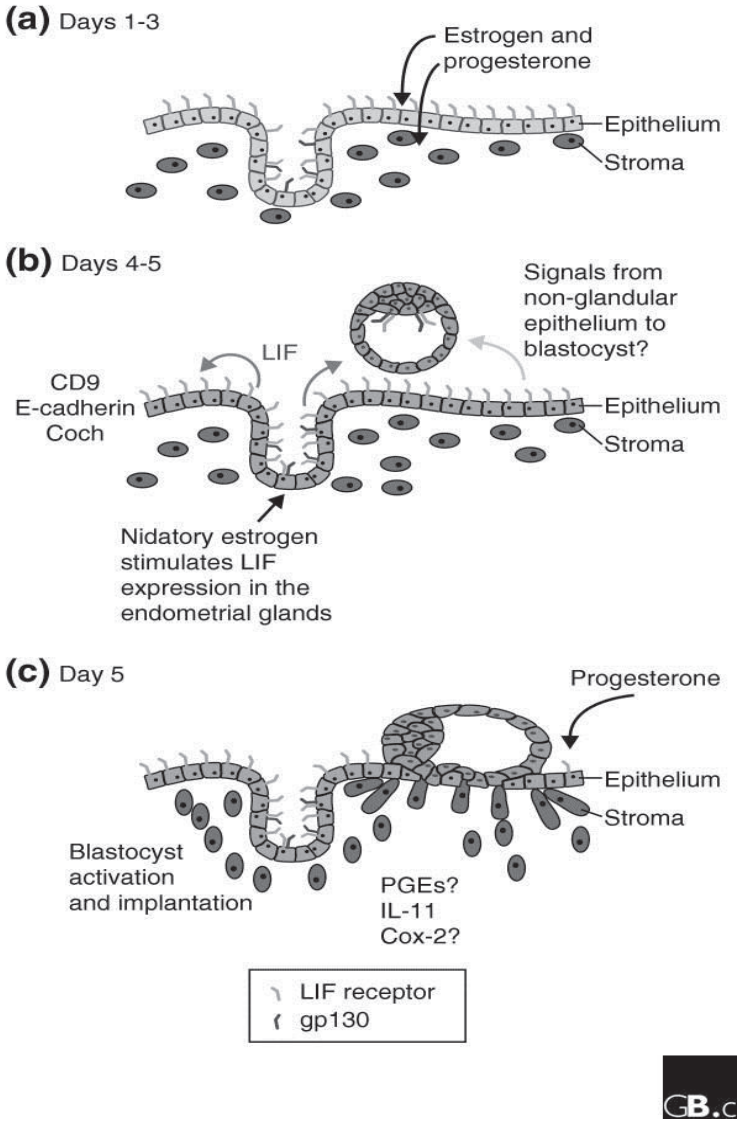


Figure 4: Implantation de l'embryon de souris dans l'utérus

(a) 3 jours après la fécondation l'utérus commence à proliférer et à se différencier sous le contrôle d'œstrogène et de progestérone.
(b) Au jour 4, le blastocyste est proche de l'utérus. Alors la production de LIF est activée par les œstrogènes contenus dans les villosités de l'utérus. Le LIF est relargué dans la lumière de l'utérus, et va se fixer sur les récepteurs de l'épithélium. Cela va induire l'expression de protéine de liaison (Cadherine E, CD9, et Coch). L'épithélium est alors prêt à recevoir le blastocyste.
(c) Au jour 5, le blastocsyte commence à coloniser l'utérus tandis que le stroma entre en decidualisation (le stroma subit énormément de changement et devient une decidua) , sous le contrôle de prostaglandine (PGE), elle-même régulée par l'interleukine 11 et Cox-2.
(Hondo and Stewart, 2005)

l'implantation, c'est-à-dire au stade blastocyste. Ce phénomène est appelé « diapause » ou « retard embryonnaire ». Ce phénomène est bien connu chez le kangourou. En effet, lorsque la femelle porte un petit dans sa poche, les ovocytes fécondés par la suite arrêtent leur développement. Si le premier petit est perdu, le développement de l'embryon stoppé est relancé. Ce phénomène existe également chez la souris. Comme nous l'avons vu précédemment, le temps de gestation des souris est relativement court. Il peut arriver que la femelle soit de nouveau gestante alors qu'elle allaite sa première portée. Comme il ne serait pas viable pour elle de nourrir deux portées ensemble, les embryons ralentissent leur développement, en attendant que la première portée soit sevrée. La diapause chez la souris est contrôlée par une cytokine appelée Leukemia Inhibitory Factor (LIF). Comme nous pouvons le voir sur la Figure 4 (Hondo and Stewart, 2005), le LIF est requis pour l'implantation de l'embryon. En absence de LIF, les embryons stoppent leur développement au stade blastocyste et rentrent en diapause (Stewart et al., 1992).

1.2 Les cellules souches pluripotentes de souris

Afin de pouvoir mieux appréhender le vaste domaine des cellules souches pluripotentes, je vais me servir du modèle murin, qui est à l'heure actuelle l'espèce la plus documentée dans ce domaine.

1.2.1 Les cellules souches embryonnaires : ESCs

1.2.1.1 La dérivation

La dérivation des ESCs à partir d'embryon de souris a bénéficié des connaissances d'un autre type de PSCs, les ECCs pour Embryonic Carcinoma Cells. Les ECCs ont été analysées (Kleinsmith and Pierce, 1964; Stevens and Little, 1954) et stabilisées en culture (Kahan and Ephrussi, 1970) à partir de la découverte de la lignée de souris 129, qui possède une forte prédisposition aux cancers du testicule. Du fait de leur capacité de différenciation, les ECCs ont été longtemps considérées comme un modèle *in vitro* de développement embryonnaire. Elles possèdent de nombreux marqueurs des cellules de l'ICM comme PCC4 (Gachelin et al., 1977) et SSEA1 (Stage Specific Embryonic Antigen 1) (Knowles et al., 1978), et elles sont capables

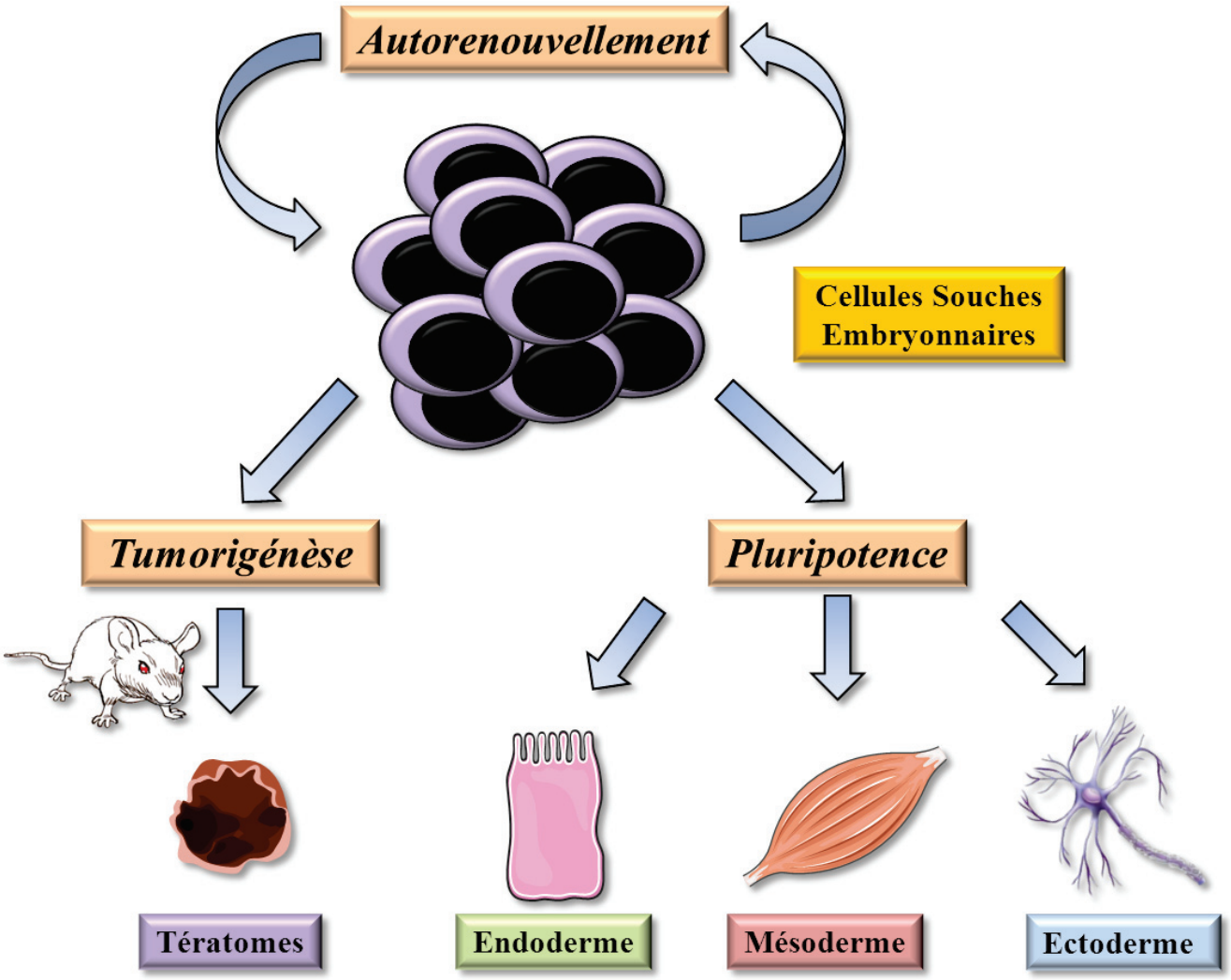


Figure 5: Les 3 propriétés fondamentales des cellules souches embryonnaires

de se différencier en plusieurs types cellulaires lors de leur injection dans un blastocyste de souris (Brinster, 1974). Cependant elles ne participent que très rarement à la lignée germinale de l'embryon hôte, car elles ont accumulé beaucoup de mutations dans leur génome.

Grâce aux études réalisées sur les ECCs et l'embryon de souris, de nombreux protocoles de culture et de dissection ont été établis (Solter and Knowles, 1975) et ont permis la dérivation des cellules souches embryonnaires (ESCs) à partir d'un ICM d'un blastocyste préimplantatoire pour la premières fois chez la souris en 1981. (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). En effet lorsque des ECCs sont cultivées, deux types de cellules se distinguent : des cellules E et des cellules C. Les cellules E sont de grandes cellules plates, proches d'un épithélium, alors que les cellules C sont de petites cellules rondes qui prolifèrent en amas. Les cellules C isolées et ensemencées vont spontanément se différencier en cellules E. Pour éviter ce phénomène, les cellules C sont cultivées sur des fibroblastes afin qu'elles puissent conserver leur capacité de tumorigénèse (Evans 1972). Comme les résultats indiquaient que les ECCs étaient proches des cellules de l'ICM, les équipes de M. Evans et de G. Martin ont naturellement dérivé les ESCs en plaçant un ICM sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), jouant le rôle de cellules nourricières. Les milieux de culture étaient également similaires. Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, les ESCs sont très proches des cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses peuvent se différencier mais de manière aléatoire contrairement aux ESCs, pour lesquelles la différenciation est maîtrisée.

1.2.1.2 Les propriétés fondamentales des ESC

Ces cellules ont deux propriétés principales. Premièrement elles peuvent s'auto-renouveller, c'est-à-dire que chaque ESC se divise en deux cellules filles identiques sans jamais se différencier, et cela indéfiniment. Deuxièmement, au cours de ces divisions, elles sont capables de conserver leur capacité à se différencier dans les trois feuillets embryonnaires (pour rappel le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme). Cette capacité leur confère le titre de cellules pluripotentes (Keller, 1995) (Figure 5) tout comme les cellules de l'ICM.

Deux autres propriétés de ces cellules sont également très importantes. La première est leur capacité à induire la formation de tumeur lorsqu'elles sont sorties de leur contexte embryonnaire. Il a été montré que lorsque les ESCs sont injectées dans des testicules de souris immunodéprimées (Nude ou SCID), elles continuent de proliférer pour former une tumeur, ce qui en fait des cellules quasi-malignes (Evans and Kaufman, 1981). Ces tumeurs sont en réalité

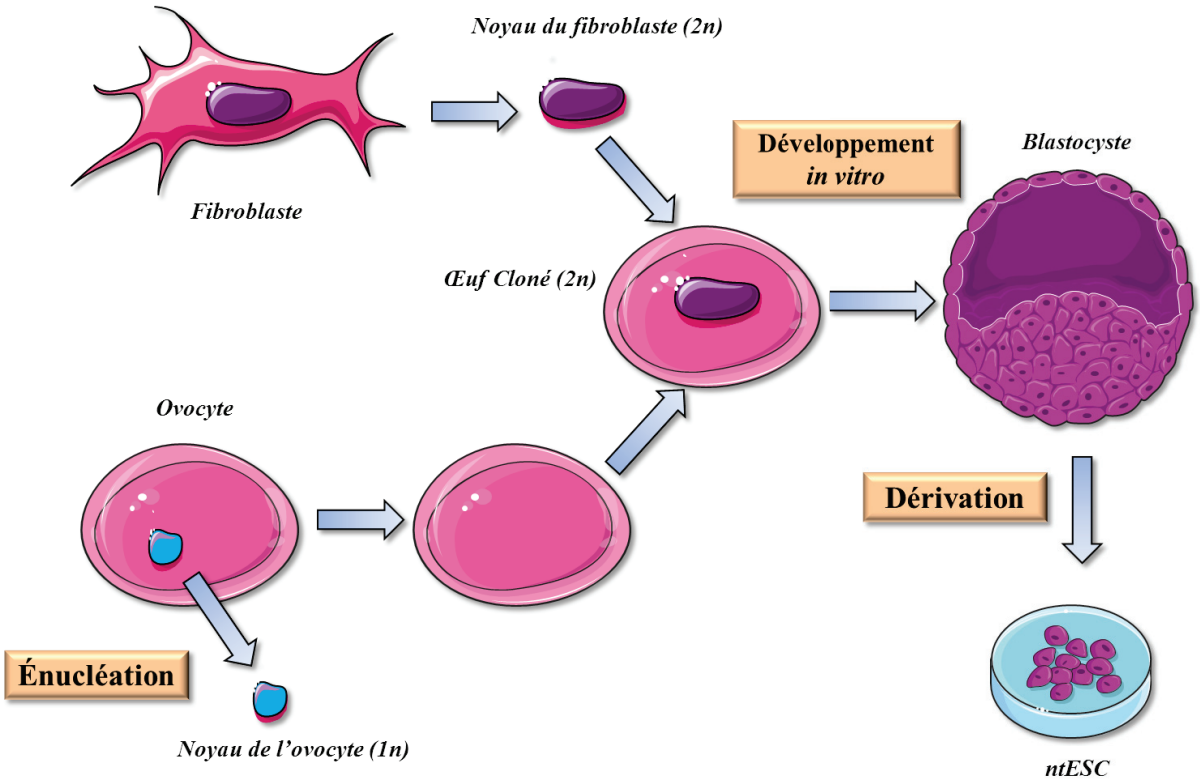


Figure 6: Obtention de ntESC à partir d'un noyau de fibroblaste

des tératomes, dans lesquels on retrouve des cellules en prolifération et des cellules très spécialisées de la même manière que dans les carcinomes embryonnaires constitués de cellules E et de cellules C. La production de tératomes est une technique fiable pour tester la capacité de pluripotence des ESCs. Une autre technique utilisée pour vérifier cette propriété consiste à produire des corps embryoïdes (EBs pour Embryoïd Bodies). Dans ce but, les ESCs sont dissociées et placées dans des gouttes en suspension, sur le couvercle d'une boîte. Les cellules vont s'agréger à la pointe de la goutte et former des amas. Ces amas sont ensuite placés sous agitation afin qu'ils continuent à proliférer sans adhérer. Les EBs miment les étapes du développement embryonnaire précoce (Wobus et al., 1991). En réalité les deux techniques sont souvent utilisées car elles permettent d'avoir une appréciation de la pluripotence des ESCs *in vivo* et *in vitro*.

La dernière propriété et surtout celle qui rend les ESCs vraiment intéressantes pour les biotechnologies, leur capacité à pouvoir coloniser l'ICM lorsqu'elles sont injectées dans un embryon (stade 8 cellules ou blastocyste) et à participer au développement embryonnaire de l'embryon hôte pour donner un individu chimère, composé de cellules de deux origines embryonnaires différentes. Si les ESCs injectées ont participé à la mise en place de la lignée germinale de l'embryon receveur, il sera alors possible, à la prochaine génération, d'obtenir un individu ayant pour origine une ESC (Bradley et al., 1984). Cette propriété est exploitée pour la production d'animaux transgéniques (souris et rat) que nous utilisons dans nos laboratoires.

Il ne faut, toutefois, pas perdre de l'esprit que ces ESCs n'existent que pendant un temps très court dans la vie d'un individu et que nous maintenons artificiellement cet état. Dans ce but elles constituent un artefact de culture cellulaire *in vitro*.

1.2.2 Les cellules souches embryonnaires issues d'embryons clonés : ntESCs

Il est possible de générer des embryons en injectant un noyau de cellule adulte différenciée dans un ovocyte au préalable énucléé (Figure 6). Ce noyau va alors être reprogrammé par les facteurs maternels présents dans le cytoplasme de l'ovocyte, et revenir à un état embryonnaire. Il est alors possible d'isoler des ESCs à partir de l'ICM des blastocystes obtenus. Le premier animal cloné a été un xénope en 1958 (Gurdon et al., 1958), puis une carpe en 1963 (Yan, 2000). Tong Dizhou est considéré depuis peu comme le « père du clonage en Chine » car son article original a été publié en Chinois et traduit que récemment. Le premier mammifère né de cette technologie est la très célèbre brebis Dolly (Wilmut et al., 1997). Il a

fallu attendre 40 ans entre le clonage du xenope et du mouton, car les chercheurs ont mis longtemps avant de se rendre compte qu'il fallait synchroniser les cellules en phase G1 pour obtenir une reprogrammation des noyaux. La première souris clonée a été publiée l'année suivante, et appelée Cumulina en raison de la cellule d'origine – une cellule du cumulus (Wakayama et al., 1998). Des lapins ont également été clonés par l'équipe INRA de Jean-Paul Renard (Challah-Jacques et al., 2003).

Seulement deux ans après la naissance de Cumulina, des ESCs dérivées d'embryons clonés (ntESCs), ont été dérivées chez la souris (Munsie et al., 2000). Cette avancée a donné lieu à beaucoup d'espoirs et de polémiques. En effet, il était alors possible d'avoir une lignée d'ESCs 100% identique donc compatible du point de vue du système d'histocompatibilité avec un individu donné. Ces espoirs ont été rendus de plus en plus concrets par l'obtention de ntESCs de macaque rhésus en 2007 (Byrne et al., 2007) et de ntESCs humaines en 2013 (Tachibana et al., 2013). Il n'y a pas, à ce jour, de cellules ntESCs de lapin. Le problème de cette technique, outre les aspects éthiques et moraux que je ne discuterais pas dans ce manuscrit, est son rendement. En effet le taux d'obtention de cellules ntESCs est très faible. L'équipe de S. Mitalipov qui a obtenu les lignées de ntESCs de macaque, renseigne que seulement 16% des embryons arrivent à se développer jusqu'au stade blastocyste et que sur un total de 304 ovocytes utilisés, seulement 2 lignées de ntESCs ont pu être dérivées (soit un taux de 0,7%) (Byrne et al., 2007). En revanche, en ce qui concerne les embryons clonés humains, le taux apparait bien plus élevé. En effet, la même équipe a utilisé de la caféine pour le développement des embryons humains, et obtenu un taux de 23% de blastocystes développés après clonage. 50% de ces blastocystes ont donné des lignées de ntESCs après isolation de l'ICM (Tachibana et al., 2013).

1.2.3 Les cellules souches pluripotentes induites : iPSCs

Afin de contrecarrer les difficultés éthiques et techniques du clonage, une nouvelle technique de reprogrammation a été mise en place en 2006 et a révolutionné la biologie. En effet, durant cette année le chercheur japonais S. Yamanaka a réussi l'exploit de ramener des cellules différenciées, telles que des fibroblastes, à un état d'ESC (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ce phénomène est appelé « reprogrammation cellulaire ». Dans ce but, il a choisi 24 gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence des ESCs, qu'il a surexprimé dans des fibroblastes de souris à l'aide de vecteurs rétroviraux afin d'obtenir des cellules ayant une morphologie proche des ESCs. Il a ensuite tenté de reprogrammer des fibroblastes en enlevant à chaque fois un des 24 facteurs jusqu'à l'isolement de quatre gènes indispensables à la

reprogrammation des cellules : les gènes *Oct4, Sox2, Klf4* et *c-Myc*. De cette manière, il a obtenu des cellules appelées « cellules souches pluripotentes induites » ou « iPSCs ». En 2007, il a reproduit cet exploit, en reprogrammant des fibroblastes humains en iPSCs (Takahashi et al., 2007). Un point vraiment important, est que S. Yamanaka a utilisé des vecteurs rétroviraux exprimant les 4 gènes d'intérêt à partir des séquences promotrices virales, appelées Long Terminal Repeat (LTR), séquences qui sont naturellement réprimées dans les ESCs. Dans les iPSCs, comme dans les ESCs, les LTR sont aussi réprimées. Il y a donc diminution de l'expression des transgènes au cours de la reprogrammation et augmentation de l'expression des gènes endogènes de pluripotence. Les iPSCs sont dites complètement reprogrammées lorsque l'expression des transgènes est nulle.

Depuis cette découverte de nombreuses investigations ont été lancées et de nombreux laboratoires ont produit des lignées d'iPSC grâce à d'autres cocktails de gènes – *Nanog* et *Lin28* remplaçant *Klf4* et *c-Myc* (Yu et al., 2007) -, grâce à des techniques non intégratives – en utilisant des adénovirus (Stadtfeld et al., 2008) - ou encore en partant d'autres types cellulaires comme par exemple des neurones, exprimant déjà fortement *Sox2* (Eminli et al., 2008). Il y a aujourd'hui une quantité très impressionnante de protocoles pour établir des iPSCs. Cette découverte a suscité de très nombreux espoirs thérapeutiques. En effet, il est dorénavant possible d'avoir des cellules souches pluripotentes ayant le même génome qu'un individu, donc 100% compatibles dans le but de réaliser des greffes. De plus, les chercheurs peuvent prélever des fibroblastes de patients atteints d'une pathologie, les reprogrammer et après différenciation dans le tissu d'intérêt, tester différentes molécules pour traiter les désordres observés. Le rendement de production d'iPSC varie énormément selon les protocoles, mais est au maximum de 0,01%. Ce chiffre peut paraitre faible, mais on peut cultiver des millions de cellules dans une boîte de culture, contrairement aux embryons clonés. En 2012, Shinya Yamanaka a reçu le prix Nobel de médecine pour ces travaux. Il a partagé son prix avec John B. Gurdon, qui a été un des pionniers du clonage, et donc de la notion de reprogrammation cellulaire, que l'on pensait impossible *in vitro* jusqu'en 2006.

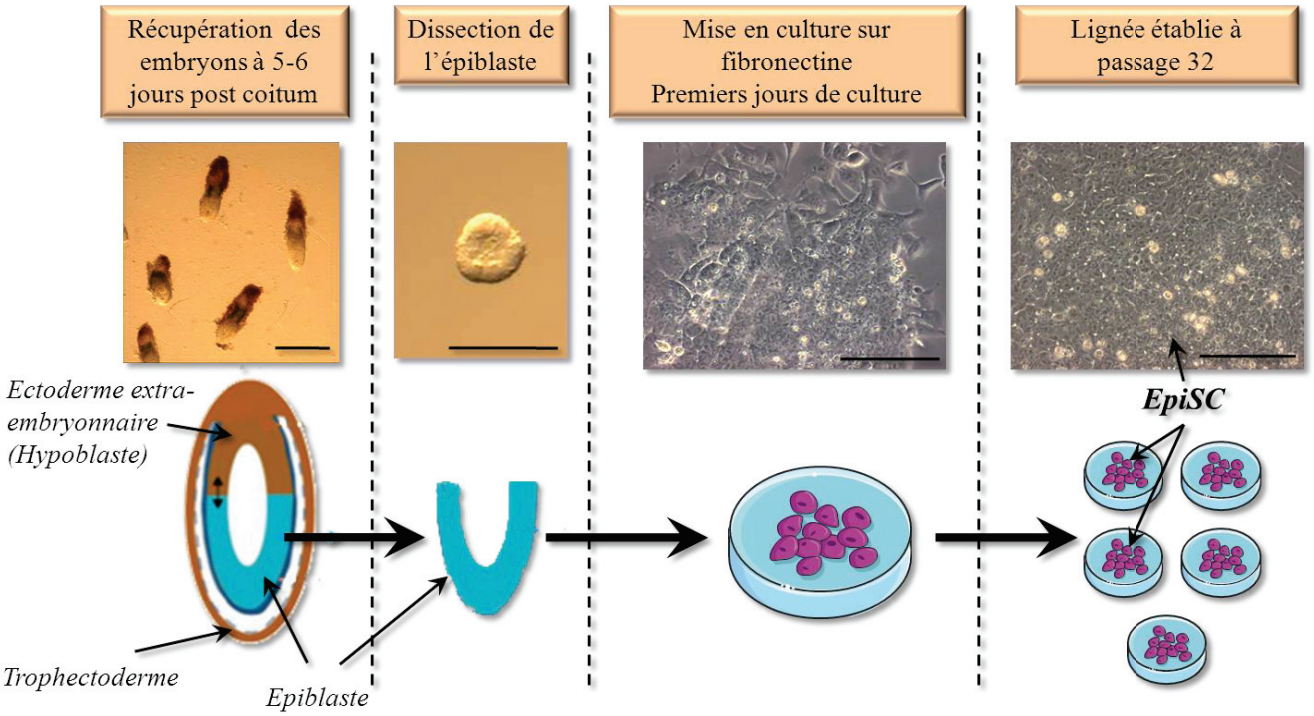


Figure 7: Obtention de lignées d'EpiSC de souris

1.2.4 Les cellules souches de l'épiblaste : EpiSCs

Les cellules souches de l'épiblaste (EpiSCs) ont été dérivées pour la première fois chez la souris en 2007 (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Elles sont issues de l'épiblaste d'embryons post-implantatoires au stade ovocylindre, c'est-à-dire au stade qui précède la gastrulation et donc l'engagement des cellules embryonnaires dans les voies de différenciation des trois feuillets embryonnaires (Figure 7). A ce stade, les cellules de l'embryon sont organisées en deux feuillets embryonnaires : l'épiblaste qui est à l'origine du fœtus et l'hypoblaste à partir duquel vont se développer les annexes embryonnaires (placenta, amnios). Les EpiSCs n'ont été obtenues que chez la souris. Elles ne se cultivent pas sur des cellules nourricières en présence de LIF comme les ESCs, mais sur de la fibronectine et dans un milieu contenant d'autres facteurs de croissance (e.g. Fibroblast Growth Factor – FGF et Activine). La différence majeure avec les ESCs, outre les variations de protocole de culture *in vitro*, est qu'elles ne sont pas capables de s'intégrer dans un blastocyste pour produire des chimères. Ce qui est en revanche très intéressant est qu'elles sont toujours pluripotentes, car elles sont capables de se différencier *in vitro* dans les trois lignages primitifs.

1.2.5 Les cellules souches adultes

Dans ce paragraphe je fais un aparté sur les cellules souches adultes simplement parce que de nombreux amalgames sont faits lorsqu'on parle de cellules souches. En général, les deux types, adultes et embryonnaires sont confondus. Seulement elles n'ont pas grand-chose en commun à part la capacité de se diviser indéfiniment. En effet, les cellules souches adultes sont, durant la majorité de leur existence en quiescence. Elles ne cyclent pas, contrairement aux ESCs qui ne peuvent stopper leur croissance. Ensuite, lorsqu'il y a un besoin spécifique dans un organisme, elles se divisent mais de manière asymétrique pour donner une cellule souche adulte qui permet de conserver le pool de cellules souches, et un progéniteur, qui va continuer sa spécialisation indépendamment de l'autre cellule. Les ESCs se divisent symétriquement. Enfin, les cellules souches adultes sont déjà engagées dans un lignage particulier, comme les cellules souches hématopoïétiques, qui peuvent se différencier uniquement en cellules du sang. Elles sont donc multipotentes (cellules souches hématopoïétiques), voir unipotentes (peau, foie ou muqueuse intestinale).

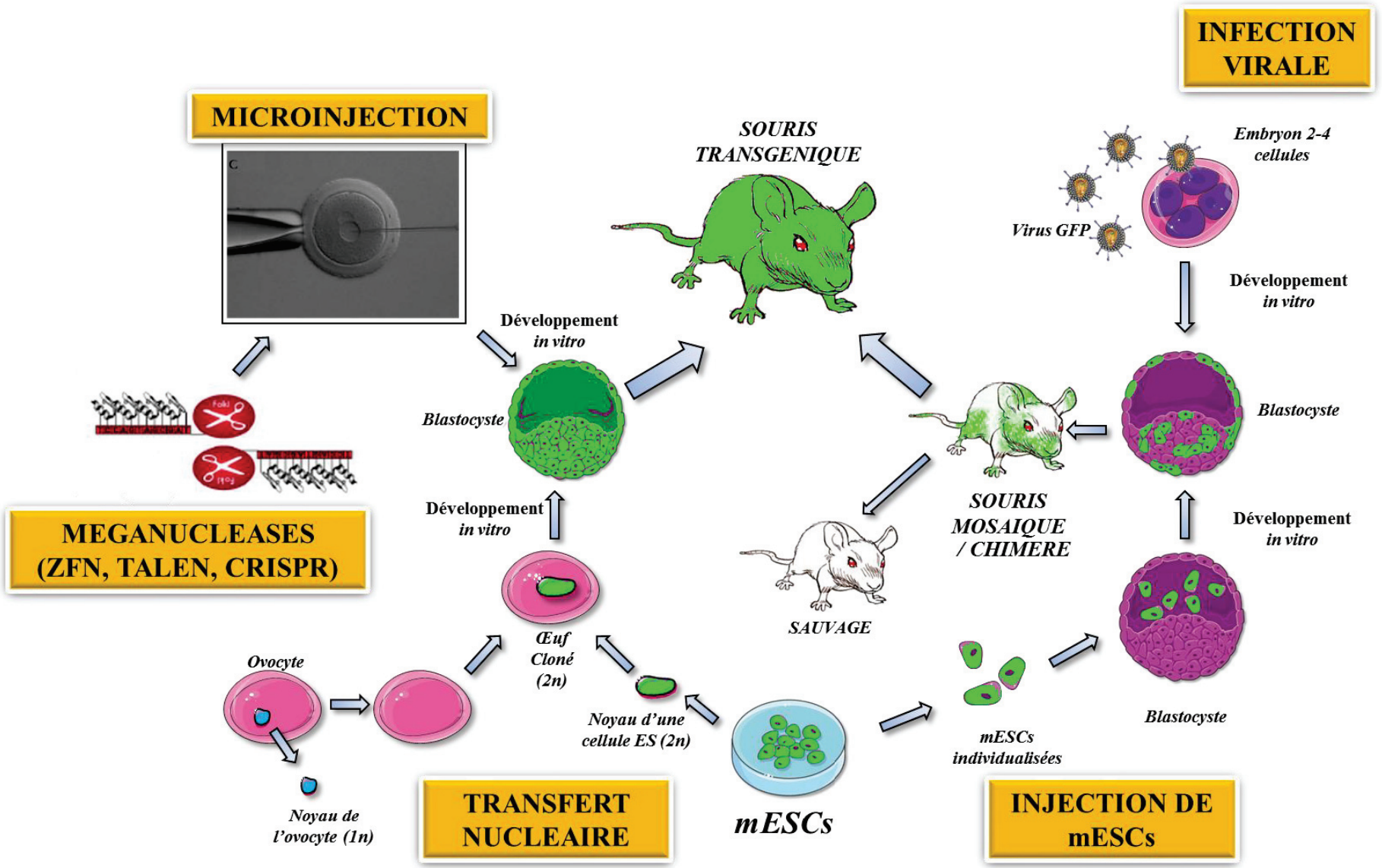


Figure 8: Les différentes méthodes pour l'obtention d'animaux transgéniques

Exemple du gène codant pour la GFP

1.2.6 Importance des cellules souches pluripotentes en transgénèse

Les PSCs sont uniques et présentent un intérêt majeur pour la recherche. Elles sont utilisées dans de nombreux protocoles de différenciation, allant de la production de neurones aux cellules musculaires. On peut alors mimer le développement embryonnaire *in vitro*, tester de nouvelles molécules sur différents types cellulaires, et dans un avenir proche (car cela a déjà débuté), s'en servir pour greffer des tissus (voir des organes) à des patients atteints de maladies dégénératives (Parkinson, etc…). Les PSCs permettent également de produire des animaux transgéniques, donc des animaux modèles de maladie humaine. Comme je l'ai dit précédemment les PSCs ont la capacité de produire des animaux chimères (Bradley et al., 1984), et donc de véhiculer un transgène à la génération suivante, si elles ont été modifiées génétiquement et ont colonisé la lignée germinale de l'individu receveur.

Il faut noter que des animaux transgéniques peuvent être obtenus par d'autres moyens que l'utilisation de PSCs. La première technique utilisée historiquement en transgénèse est la microinjection d'ADN nu dans le pronucléus mâle du zygote au moment de la fusion. L'ADN des pronuclei est alors complètement ouvert, c'est-à-dire que les chromosomes ne sont pas compactés et l'ADN transgène peut alors s'intégrer dans celui de l'embryon. L'individu issu de cette technique est alors directement transgénique (bien que souvent l'ADN ne s'intégre qu'après plusieurs divisions cellulaires, ce qui produit un individu mosaïque). La seconde technique très utilisée en transgénèse dans les années 80 consiste à infecter l'embryon pré-implantatoire par injection d'un rétrovirus, véhiculant un gène d'intérêt entre la ZP et les cellules embryonnaires. Le principal inconvénient de ces deux méthodes est que de nombreuses copies du transgène peuvent s'insérer dans le génome de l'embryon hôte et ce de manière aléatoire, ce qui conduit à des modifications très importantes et non contrôlées du génome, entraînant potentiellement l'apparition de tumeurs (Figure 8). Or avec l'utilisation de PSCs, il est possible de modifier les cellules par recombinaison homologue, c'est-à-dire par une insertion de transgène ciblée et unique (Doetschman et al., 1987; Thomas and Capecchi, 1987). Les PSCs ainsi modifiées, sélectionnées et contrôlées sont ensuite utilisées soit pour produire des chimères en injectant les cellules dans un embryon au stade blastocyste, soit pour cloner l'individu par transfert nucléaire (Figure 8). Le clonage peut être réalisé avec d'autres types cellulaires mais la recombinaison homologue étant un évènement rare, il est préférable d'employer des cellules qui prolifèrent beaucoup et longtemps pour pouvoir les sélectionner, d'où l'intérêt essentiel des PSCs.

Une nouvelle technique de transgénèse très prometteuse a fait son apparition récemment, il s'agit de l'utilisation de méganucléases qui permettant une reconnaissance spécifique de séquence ADN (Gaj et al., 2013). Les plus couramment utilisées sont les nucléases en doigt de zinc (ZFNd, Zinc Finger Nucléases) et les TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease). Ce sont des enzymes de restriction artificielles. Elles sont composées d'un domaine de liaison à l'ADN (Les ZFNs ou les TALEs) et de la nuclase FokI. Cette enzyme coupe l'ADN lorsque deux sites de clivage sont présents (un sur chaque brin). En couplant deux séquences spécifiques aux sites de coupure (sens et anti-sens) on peut alors cibler un gène d'intérêt. Il existe une troisième méthode basée sur l'utilisation de nucléases : les CRISPRs (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Les CRISPRs ont été découvertes dans les bactéries. Ce sont des petites séquences d'ADN insérées dans un génome qui permettent la reconnaissance de séquences étrangères telles que des séquences virales ou des plasmides. Lorsque des pathogènes transmettent des séquences d'ADN aux bactéries, celles-ci les détruisent et insèrent de petits fragments (une dizaine de nucléotide) dans leur génome, cela leur permet d'être plus efficaces lors d'une nouvelle infection. Ces séquences associées aux protéines CAS (Crispr Associated) peuvent détecter des ADNs étrangers et les détruire ; cela ressemble fortement au système immunitaire. Les propriétés des CRISPRs et de FokI ont été exploitées pour réaliser de la transgénèse ciblée. Leur efficacité dépend du gène ciblé.

Les CRISPR semblent être les plus efficaces et les moins couteux mais aussi les moins spécifiques des techniques utilisant les méganucléases. Celles-ci sont très efficaces pour réaliser des KO, mais leur utilisation est plus délicate pour induire des KI. Dans ce dernier cas la mutagénèse ciblée classique et la recombinaison homologue, s'avèrent être pour l'instant les techniques les plus fiables. Pour cette raison il est nécessaire de travailler avec des PSCs.

Les ESCs ont ainsi permis de développer les techniques de mutagénèse ciblées chez la souris et de créer de nombreuses lignées de souris transgéniques et de souris Knock-Out (KO) et Knock-In (KI), outils indispensables et très performants pour mieux comprendre les mécanismes génétiques, moléculaires, cellulaires et physiologiques. Grâce à cette technique des souris modèles de maladie pour tous les domaines de la recherche médicale peuvent être créées. Mais elle n'est applicable que chez la souris et le rat – espèce où des chimères ont été produites récemment (Buehr et al., 2008; Li et al., 2008), car les PSCs des autres espèces n'ont jusqu'à présent jamais pu coloniser un embryon receveur pour donner une chimère somatique ou germinale.

1.3 Les cellules pluripotentes chez les autres mammifères

Comme je viens de le préciser, seules les PSCs de rongeurs ont la capacité de donner des chimères. Nous allons essayer d'élucider cette particularité, mais auparavant il est nécessaire de faire un tour d'horizon des PSCs chez les espèces de mammifères autres que la souris et le rat.

1.3.1 Les cellules pluripotentes simiennes

Les premières lignées d'ESC de singe sont issues de l'espèce macaque rhésus (rhESCs) et ont été dérivées en 1995 par Thomson (Thomson et al., 1995). Cette découverte a ouvert la voie à l'utilisation de ce primate en tant que modèle humain beaucoup plus pertinent que la souris. En effet, toutes les données obtenues chez la souris ne sont pas systématiquement transposables à l'Homme et il est souhaitable de développer d'autres modèles animaux. Les scientifiques ont alors placé beaucoup d'espoir dans la création de singes transgéniques modèles de maladie humaine, ou dans l'utilisation du singe pour la mise au point de techniques de thérapie par remplacement cellulaire. Ainsi notre laboratoire a réussi à dériver une lignée de rhESC appelée « LYON-ES ». Celle-ci a été modifiée génétiquement pour exprimer la protéine Tau couplée à la protéine fluorescente verte (GFP) (Wianny et al., 2008). La protéine Tau est une protéine associée aux microtubules, fortement exprimée dans les neurones. Dans des expériences de thérapie par remplacement cellulaire, ces rhESCs différenciées préalablement en neurones présentent l'avantage de pouvoir être suivies au sein des tissus greffés chez un animal grâce à l'expression de la GFP.

Cependant l'utilisation des singes à des fins expérimentales est très réglementée et très limitée, car ce sont des animaux protégés. De plus c'est un animal coûteux à élever et peu prolifique (1 descendant par portée). Ainsi, la récupération des ovocytes ou des embryons doit être réalisée sans euthanasier l'animal et nécessite une opération chirurgicale très lourde (laparoscopie) qui limite considérablement le nombre d'embryons utilisable pour la dérivation de rhESCs. Afin de contrecarrer ces difficultés, les premières lignées d'iPSC de singe ont été créés en 2008 (Liu et al., 2008). Malgré ces différents écueils, le singe reste un modèle de choix et les recherches en vue de l'obtention d'animaux chimères, soit par micro-injections de PSCs dans le blastocyste, soit par transfert nucléaire (Byrne et al., 2007), se poursuivent. Néanmoins, ces travaux aboutissent actuellement à la conclusion que les rhPSCs ne sont pas capables de coloniser un blastocyste receveur pour produire des animaux chimères comme chez la souris.

1.3.2 Les cellules pluripotentes humaines

Les ESCs humaines (hESCs), dérivées pour la première fois en 1998 (Thomson, 1998), ont créé de grands espoirs quant à leur utilisation en médecine régénérative pour traiter des maladies dégénératives comme les maladies de Parkinson ou de Huntington. En effet, en orientant leur différenciation *in vitro* vers un type cellulaire donné, le but est de remplacer chez des patients les cellules ayant dégénérées. Mais le développement des thérapies par remplacement cellulaire est confronté aux problèmes immunitaires induits par des greffes hétérologues et aux problèmes éthiques dus à l'utilisation d'embryons humains. Pour les problèmes immunitaires, les solutions envisagées se tournent vers la production d'iPSC (Takahashi et al., 2007) ou de ntESC (Tachibana et al., 2013). Concernant les problèmes éthiques, il est interdit légalement en France, comme dans la plupart des autres pays européens, de produire des embryons humains à des fins expérimentales et encore moins des embryons chimères ou des embryons clonés. On ne peut utiliser que des embryons surnuméraires issus de fécondation *in vitro* (FIV) pour dériver de nouvelles lignées de hESCs dans un but fondamental, afin de comprendre les mécanismes du développement embryonnaire humain ou de développer des méthodes de différenciation de ces cellules.

En France, il est possible de travailler avec des lignées dérivées dans d'autres pays (depuis 2004), comme les lignées H1 et H9 obtenues par l'équipe de Thomson. Mais il reste important de pouvoir dériver des lignées de hESCs dans un laboratoire donné et ce pour deux raisons. La première est de pouvoir ainsi travailler sur des cellules à passages précoces (c'est-à-dire inférieurs à 10) pour que les hESCs aient une intégrité génétique proche des cellules de l'embryon. Les lignées importées sont généralement au passage 25, et ne permettent donc pas la réalisation du même type d'étude. La seconde raison est de pouvoir maîtriser les conditions de culture et la qualité des cellules dérivées, qui n'ont pas à subir une adaptation de culture et donc un stress comme c'est le cas des lignées importées. La possibilité de dériver de nouvelles lignées a été acceptée très tardivement par les comités français d'éthique (2006) et les protocoles utilisés sont soumis à l'approbation de l'Agence de Biomédecine qui effectue des contrôles très stricts. Depuis le 16 juillet 2013, la recherche sur l'embryon et les hESCs a été autorisée par l'Assemblée Nationale, en vertu de « la dignité humaine de l'embryon, du choix du progrès, de l'espoir et de la confiance dans les chercheurs » (propos de Jean-Louis Touraine, immunologiste et politique lyonnais, défendant le projet de loi à l'Assemblée Nationale le 16 Juillet dernier).

1.3.3 Les cellules pluripotentes de lapin

Aux vues des problèmes que l'on peut rencontrer par l'utilisation du modèle primate humain et non-humain, il apparait essentiel de trouver un modèle alternatif. C'est dans ce contexte que le lapin s'avère intéressant. En effet, cette espèce est phylogénétiquement plus proche de l'Homme que ne l'est la souris. Son métabolisme lipidique est très proche de celui de l'Homme, la placentation des femelles et les réponses immunitaires sont très similaires. De plus cette espèce est très prolifique, environ 12 embryons par portée et en moyenne 40 (jusqu'à 100 embryons dans certains cas) quand la production d'ovocyte est stimulée grâce à la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) et la FSH (Follicle Stimulating Hormone). Sa taille est idéale car assez petite pour faciliter son élevage à faible coût en animalerie, et assez grande pour pouvoir réaliser des expériences chirurgicales trop minutieuses chez la souris ou le rat. Enfin, du point de vue bioéthique, la législation est beaucoup plus souple envers son utilisation en laboratoire que pour les primates non-humain (Fan and Watanabe, 2003). Tous ces arguments font du lapin un excellent modèle alternatif pour les chercheurs. En ce qui concerne la dérivation d'ESC de lapin (rbESCs), il est très facile de collecter un grand nombre d'embryon par stimulation ovarienne, donc de pouvoir dériver un grand nombre de lignée de rbESC. De plus, le développement embryonnaire du lapin est plus proche de celui de l'Homme que de celui de la souris, du fait de l'absence de diapause et de l'expression de certains facteurs de transcription que nous détaillerons dans le chapitre 4.

Les premières publications relatant la dérivation de rbESCs datent des années 90, mais les cellules issues d'ICM décrites alors ne pouvaient pas être maintenues en culture sans différenciation (Giles et al., 1993; Moreadith and Graves, 1992; Schoonjans et al., 1996).Les premières lignées de rbESCs stables *in vitro,* ont été dérivées entre 2006 et 2008, par des équipes chinoises et japonaises (Fang et al., 2006; Honda et al., 2008; Wang et al., 2007a).Ces lignées sont cependant incapables de coloniser un embryon pour produire des chimères somatiques ou germinales (Honda et al., 2008),même si de rares exceptions ont été publiées sans pouvoir être reproduites ou confirmées (Fang et al., 2006; Zakhartchenko et al., 2011). Elles requièrent deux facteurs de croissance pour se maintenir à l'état indifférencié en culture : le FGF2 et l'Activine qui active la voie de signalisation des Smads (Honda et al., 2008; Wang et al., 2008a), bien que le LIF semble faciliter leur dérivation (Hsieh et al., 2011; Intawicha et al., 2009). Les premières lignées de rbiPSCs ont été obtenues par reprogrammation de cellules de foie ou d'intestins à l'aide de vecteurs rétroviraux exprimant les gènes Oct4, Sox2, Klf4 et cMyc (Honda et al., 2010). Nous nous sommes basés sur le milieu de culture utilisé par cette

équipe japonaise pour établir nos propres lignées de rbESCs et de rbiPSCs (Osteil et al., 2013). Ces lignées, comme toutes les lignées de PSCs de singe décrites, présentent les principales caractéristiques des PSCs, mais ne participent pas au développement embryonnaire lorsqu'elles sont injectées dans un blastocyste receveur.

1.3.4 Les cellules pluripotentes chez les autres espèces

Des ESCs et iPSCs ont pu être établies chez d'autres espèces comme le macaque cynomolgus (Suemori et al., 2001), le marmoset (Thomson et al., 1996), le cheval (Saito et al., 2002), le poulet (Pain et al., 1996) , le buffalo (Sritanaudomchai et al., 2007) et le porc (Yang et al., 2009), etc... A part les ESCs de poulet (qui ne sont pas des mammifères), aucune autre lignée d'ESC ou d'iPSC décrites jusqu'à présent, n'a la capacité de former des chimères somatiques et germinales. Seules les ESCs de souris et de rat (dans des conditions particulières pour ce dernier) peuvent produire des individus chimères.

1.4 Les mécanismes moléculaires de la pluripotence

Au début de cet exposé, nous avons défini la notion de pluripotence des PSCs. Nous allons maintenant aborder les mécanismes impliqués dans le maintien de cette pluripotence. Encore une fois, je comparerai les PSCs de souris avec celles de tous les autres mammifères, afin de mieux comprendre la particularité des PSCs de rongeur.

1.4.1 Le noyau de pluripotence

Lors des premières études sur les mécanismes moléculaires permettant de supporter la croissance des PSCs, les chercheurs ont mis en évidence 3 gènes indispensables, *Oct4, Nanog* et *Sox2*, capables de s'auto-activer et formant le « noyau de pluripotence ». Depuis, d'autres gènes dont l'activité est cruciale pour l'autorenouvellement, comme *Klf2, Esrrb* et *Tbx3,* ont intégré ce noyau. Nous avons déjà évoqué certains de ces gènes lorsque nous avons parlé de reprogrammation cellulaire. Nous allons maintenant nous intéresser à leur fonctionnement et à leur importance pour les PSCs. Tous les gènes dont je vais détailler le rôle, sont impliqués dans de grandes boucles de contrôle et de rétrocontrôle positif ou négatif, qui permettent à ces

facteurs de conserver un niveau de régulation très fin et une grande redondance dans leur activité.

1.4.1.1 Oct4 (Pou5F1)

Oct4, un membre de la famille des facteurs de transcription à homéodomaine POU (Pict, Oct et Unc), connu également sous le nom de *Pou5f1*, s'avère être essentiel pour la dérivation et le maintien des PSCs (Pesce et al., 1998). Il est exprimé chez la souris uniquement dans les embryons précoces et les cellules germinales (Scholer et al., 1989). Sa délétion entraîne une mauvaise formation de la masse cellulaire interne et est létale. En effet , il n'y a pas de formation de l'ICM chez les embryons *Oct4-/-*, lors du développement embryonnaire (Nichols et al., 1998). Le même résultat est observé si on inhibe l'expression d'*Oct4* à l'aide d'un siRNA (Kim et al., 2002).

Chez l'embryon de souris, *Oct4* est exprimé seulement dans l'ICM (Rosner et al., 1990) alors que chez la plupart des autres espèces de mammifères, *Oct4* est exprimé indifféremment dans l'ICM et dans le TE. C'est le cas chez le porc (Kirchhof et al., 2000), le bœuf (Berg et al., 2011), le singe (Mitalipov et al., 2003), l'Homme (Van der Jeught et al., 2013) et le lapin (Chen et al., 2012b; Kobolak et al., 2009). L'espèce souris possède donc une régulation unique d'*Oct4* dans l'embryon. La ségrégation entre l'ICM et le TE se fait chez la souris comme chez les autres espèces par l'expression de *Cdx2* dans les cellules du trophectoderme (Niwa et al., 2005). Chez l'Homme, OCT4 n'est restreint à l'ICM qu'au 6ème jour post-coïtum (dpc), contrairement à son extinction chez la souris à 3,5 dpc, et CDX2 ne commence à être exprimé uniquement quand la couche de cellules qui va former le TE est déjà présente, soit à 5 dpc (Chen et al., 2012a). CDX2 est connu pour jouer un rôle antagoniste à OCT4, d'où le fait qu'OCT4 n'est réprimé que lorsque CDX2 est exprimé. Ce mécanisme a été également observé chez le porc et le bœuf (Kuijk et al., 2008).

Le taux d'expression d'*Oct4* doit être maintenu à un niveau précis afin que les PSCs murines restent indifférenciées en culture. En effet, une surexpression de ce gène conduit à une différenciation en endoderme et en mésoderme, tandis qu'une répression entraine une différenciation en ectoderme (Niwa et al., 2000). De même une diminution de l'expression de *Oct4* dans les ESCs humaines conduit également à une différenciation mais en cellules de type trophoblastique (Matin et al., 2004). OCT4 régulent plusieurs gènes comme *Fgf-4, Utf1*, *Sox2, Fbxo15* et *Rex1*.

1.4.1.2 Sox2

Sox2 est un membre de la famille des facteurs de transcription à domaine High Mobility Group (HMG) apparenté à *Sry*, et joue aussi un rôle très important dans l'autorenouvellement des PSCs. Il doit lui aussi être maintenu à une concentration spécifique, afin d'éviter la différenciation des mESCs en cellules du neurectoderme, du mésoderme ou du trophectoderme (Fong et al., 2008; Kopp et al., 2008). Il est exprimé dans les cellules E mais également dans certaines cellules différenciées comme les neurones (Kamachi et al., 2000).

Oct4 et *Sox2* agissent souvent en complexe pour réguler leurs gènes cibles. Le premier gène qui a permis de révéler leur partenariat est *Fgf-4* (Yuan et al., 1995), acteur indispensable de la survie de l'embryon de souris post-implantatoire (Feldman et al., 1995). En effet, l'enhancer de *Fgf-4*, dans la partie non transcrite de l'exon 3, est composé du site de fixation d'OCT4 juxtaposé à celui de SOX2. *Utf1* (Nishimoto et al., 1999), *Fbxo15* (Tokuzawa et al., 2003) et *Sox2* (Tomioka et al., 2002) sont également régulés par ce complexe.

1.4.1.3 Nanog

Le nom « Nanog » vient de la mythologie celtique, dans laquelle « Tir Na Nog » est le lieu de la jeunesse éternelle où se repose les âmes en attente d'une nouvelle vie. Au niveau cellulaire, *Nanog* est un gène à homéodomaine dont l'expression décroit rapidement lors de la différenciation des PSCs, de la même façon que celle de *Oct4* (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Dans l'embryon au stade blastocyste, l'ICM va se spécialiser en deux feuillets : l'hypoblaste ou endoderme primitif (PE) et l'épiblaste (EPI). Les cellules de l'ICM de souris expriment exclusivement *Nanog* ou *Gata6* selon leur devenir, respectivement EPI ou PE (Chazaud et al., 2006; Plusa et al., 2008). En fait les blastomères murins expriment les deux facteurs de transcription jusqu'au stade 3,5 dpc et perdent ensuite progressivement l'expression de l'un ou de l'autre facteur (Plusa et al., 2008). En ce qui concerne cette étape de nombreuses questions restent en suspens pour l'espèce humaine. Il a été montré que toutes les cellules n'exprimaient pas *Nanog* (Cauffman et al., 2009; Kimber et al., 2008), ce qui a été confirmé par une analyse en « single cell RNAseq » (Yan et al., 2013). Cette étude récente montre que les cellules de l'EPI expriment fortement *Oct4, Nanog, Sox2* et *Klf4*, les cellules du PE *Fgf4* et *Nodal,* tandis que les cellules composant le TE expriment fortement *Cdx2, Gata2* et *Klf5*. Il semble donc que la discrimination entre EPI et PE soit proche de celle trouvée chez la souris bien que le timing soit différent.

Au sein des ESCs, à l'inverse de *Oct4*, la surexpression de *Nanog* facilite l'autorenouvellement des cellules souches pluripotentes murines (Chambers et al., 2003). De même, les hESCs surexprimant *Nanog* peuvent être cultivées sans cellules nourricières et ont une meilleure capacité de clonage (Darr et al., 2006). De plus, la répression de *Nanog* entraîne une différenciation des ESCs murines et humaines en cellules des tissus extra-embryonnaires (Chambers et al., 2003; Hyslop et al., 2005; Mitsui et al., 2003). Mais l'expression de *Nanog* n'est absolument pas requise car des mESCs peuvent être maintenues en culture en son absence (Chambers et al., 2007). Comme je l'ai précisé au début de ce chapitre, *Oct4*, *Nanog* et *Sox2* s'autorégulent et se régulent entre eux, ainsi l'absence d'expression de Nanog est sûrement compensée par l'expression d'autres gènes de pluripotence. *Nanog* semble donc très important mais pas indispensable.

1.4.1.4 La famille des KLF

Trois facteurs de la famille des Krüppel Like Factor (KLF) sont impliqués dans le maintien de la pluripotence des ESCs : KLF2, KLF4 et KLF5. Ce sont des facteurs de transcription de la catégorie des protéines en doigts de zinc (Zinc-finger protéins). KLF4 (aussi connu sous le nom de Gut-enriched Krüppel like factor ou Gklf), est le premier des facteurs aavoir été identifié dans le réseau de pluripotence, fait partie des facteurs les plus exprimés par les mESCs (Li et al., 2005). Ensuite, lors de la création de lignées d'iPSC, son rôle dans la reprogrammation a été identifié en révélant sa fixation sur les promoteurs des 4 facteurs de reprogrammation *Oct4, Klf4, Sox2* et *C-myc* (Kim et al., 2008). Lorsque l'expression d'un des trois gènes *Klf* est annulée, il n'y a pas de différenciation des mESCs. Des résultats similaires sont observés lorsque deux de ces trois membres sont réprimés. En revanche, si l'expression des 3 facteurs est annulée, les mESCs se différencient (Jiang et al., 2008). Ceci montre que ces trois facteurs ont une activité redondante. Ils s'autorégulent aussi entre eux pour maintenir un équilibre très fin. *Klf4, Klf2* (aussi connu sous le nom de long Krüppel like factor) et *Klf5* (aussi connu sous le nom de intestine-enriched Krüppel like factor) activent *Oct4, Sox2* et *Nanog* et ainsi stimulent l'autorenouvellement des mESC (Bourillot et al., 2009; Jiang et al., 2008). Mais ce schéma n'est pas aussi simple qu'il n'y parait. En effet, si on regarde de plus près les mécanismes de régulation, on peut classer les 3 gènes *Kfl* selon leur potentiel de reprogrammation (Nakagawa et al., 2008): *Klf2* est le plus puissant, *Klf4* est intermédiaire, tandis que *Klf5* semble être le moins efficace (Hall et al., 2009). De plus, il s'avère qu'*Oct4*

active seulement *Klf2* (Hall et al., 2009) tandis que *Nanog* active *Klf4* et *Klf5* (Bourillot et al., 2009).

1.4.1.5 Esrrb

Esrrb (Estrogen Related Receptor Beta) est un récepteur orphelin qui agit avec des récepteurs à l'œstrogène. Récemment deux équipes ont publié des données sur le rôle d'*Esrrb* qui permettent de l'inclure dans le noyau de pluripotence (Festuccia et al., 2012; Martello et al., 2012). Une délétion du gène *Esrrb* lors du développement embryonnaire entraine la mort de l'embryon durant la gestation à cause d'un défaut de formation du placenta (Luo et al., 1997). De plus *Esrrb* peut remplacer *Klf4* pour la reprogrammation mais avec une efficacité moindre (Feng et al., 2009). L'action de ce gène consiste à se fixer sur le promoteur d'*Oct4* qui va ensuite lui-même réguler l'activité transcriptionnelle de *Nanog* (Van den Berg et al., 2008). D'un autre côté, il a aussi été montré qu*'Essrb* interagit avec *Nanog* pour aller, réciproquement, réguler *Oct4* (Zhang et al., 2008). La même étude a montré qu'une surexpression d'*Esrrb* pouvait maintenir la pluripotence des ESCs de souris en absence de LIF. Toutes ces études font d'*Esrrb* un gène clef de la régulation du noyau de pluripotence.

1.4.1.6 Tbx3

Tbx3 (T-Box transcription factor) est un membre d'une famille de gènes qui partage le site de fixation à l'ADN T-Box. Les gènes de la famille T-Box codent pour des facteurs de transcription impliqués dans le développement. Il a été montré qu'une déplétion totale de *Tbx3* dans des embryons murins et humains était létale (Davenport et al., 2003). De la même façon que *Klf2* et *Klf4*, *Tbx3* est capable de soutenir l'autorenouvellement des mESCs (Niwa et al., 2009). Lorsque *Tbx3* est inhibé par interférence à ARN les mESCs se différencient dans la voie du mésoderme (Ivanova et al., 2006). Enfin, *Tbx3* promeut également la formation d'iPSCs murines (Han et al., 2010b). Tous ces arguments font de *Tbx3* un acteur indispensable du noyau de pluripotence.

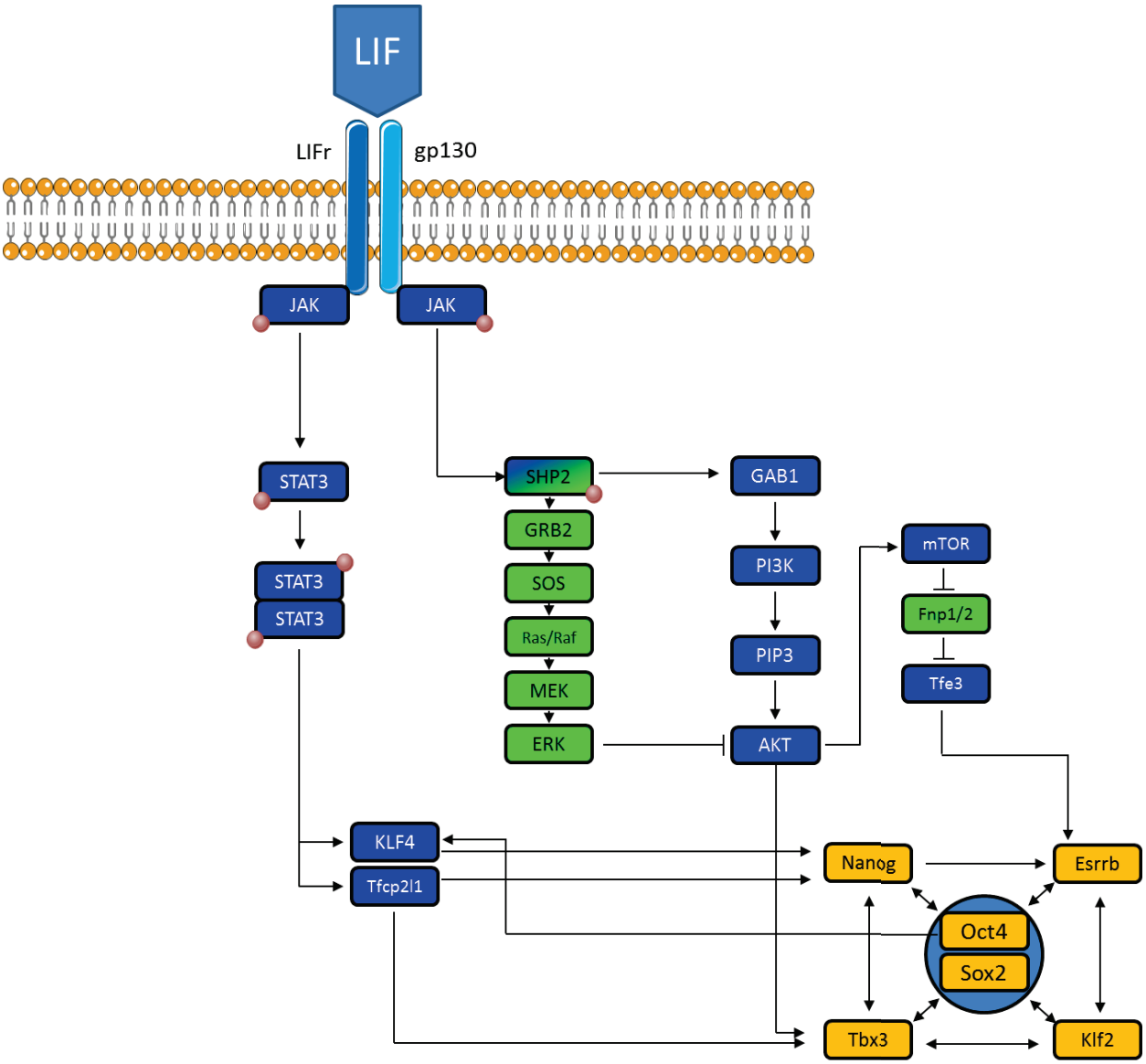


Figure 9: Les voies de signalisation du LIF

Légende : Couleur jaune : gène du noyau de pluripotence. Couleur bleue : voies de signalisations permettant l'activation du noyau de pluripotence. Couleur verte : voies de signalisations entraînant l'inhibition des gènes du noyau de pluripotence.

SHP2 est responsable de l'activation de la voie des PI3K et des MAP-K qui sont des voies ayant des effets antagonistes sur l'autorenouvellement.

1.4.2 Les voies de signalisation de la pluripotence

1.4.2.1 La voie LIF/STAT3

1.4.2.1.1 Dans les ESCs de souris

Les mESCs peuvent se cultiver en absence de cellules nourricières en ajoutant dans le milieu du Leukemia Inhibitor Factor (LIF) (Smith et al., 1988; Suda et al., 1987; Williams et al., 1988). Il a été montré que les mESCs ne pouvaient proliférer sur des fibroblaste dont le gène LIF était muté (Stewart et al., 1992). Le LIF est une cytokine de la famille de l'interleukine 6 (IL-6) qui se fixe à un complexe constitué de deux protéines transmembranaires : le récepteur β du LIF (LIFRβ) et la gp130 qui est le récepteur commun à tous les membres de la famille des IL-6 (ou encore gp190 qui est spécifique au LIF) (Taga and Kishimoto, 1997; Yoshida et al., 1994). La fixation du LIF sur ce complexe entraîne le recrutement des kinases JAK (Janus-Associated tyrosine Kinase) qui phosphorylent le facteur de transcription STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription factor) sur la Tyrosine 705 (Y705) (Zhong et al., 1994). Cette phosphorylation va entraîner la dimérisation de STAT3, sa translocation dans le noyau et enfin son action activatrice de la transcription des gènes nécessaires à l'autorenouvellement tels que *Klf4,* lui-même capable de stimuler l'expression de *Sox2* et *Nanog*. (Burdon et al., 1999; Niwa et al., 1998). L'activation de STAT3 dépend également d'une autre phosphorylation sur la Serine 727 (S707). En effet, une étude a montré que des lignées d'ESCs de souris mutantes pour STAT3 (la Sérine 727 étant remplacée par une Alanine) avaient un niveau de STAT3 actif moins élevé (Wen et al., 1995) (Figure 9).
Il existe également une deuxième voie d'autorenouvellement stimulée par le LIF, la voie de la PI3K (Phosphatidylinositol-3-OH Kinase). Cette dernière stimule les kinases de la famille AKT (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase) qui activent le gène *Tbx3* dont *Nanog* et *Sox2* sont des gènes cibles (Niwa et al., 2009). Il a été montré récemment qu'AKT activait également *mTOR*, responsable de l'inhibition de *FNP1/2*, un inhibiteur de *TFE3* ; or *TFE3* active *ESRRB* donc *AKT* active indirectement *ESRRB* (Betschinger et al., 2013) (Figure 9).

Par ailleurs, il est prouvé que le LIF active aussi une troisième voie de signalisation antagoniste aux deux premières, la voie des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), qui entraîne la différenciation des mESCs (Burdon et al., 1999; Takahashi-Tezuka et al., 1998). Cette voie est initiée par la fixation du LIF sur le complexe LIFRβ/gp130 et conduit à

l'activation de la tyrosine-phosphatase SHP2 (nom complet : SH-PTP2 ou encore PTPN11 pour protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11), qui va recruter le complexe GRB2 (Growth Factor Receptor Binding Protein 2). GBR2 active à son tour la voie des MAPKs avec une cascade de phosphorylation des kinases MEKs (MAP Kinase Kinases) et ERKs (Extracellular signal-Regulated Kinase) (Kolch, 2000), qui vont pouvoir se transloquer dans le noyau pour activer des gènes de différenciation et réprimer des facteurs de pluripotence. C'est un équilibre entre ces trois voies de signalisation activées par le LIF qui permet aux mESCs de se maintenir en autorenouvellement.

1.4.2.1.2 Les cibles de STAT3

Après sa translocation dans le noyau, le dimère STAT3 active ces gènes cibles. Parmi eux, il y a des gènes régulant le cycle cellulaire et plus particulièrement la transition G1/S (détaillée dans le chapitre 5.5) comme *c-fos, junB* et *c-jun* (Duval et al., 2000; Matsuda et al., 1999). Une des cibles principales de STAT3 est le gène *Socs-3* (Suppressor of cytokine signaling 3) qui est un inhibiteur des protéines kinases JAK et qui agit ainsi comme un signal de rétrocontrôle négatif de la voie LIF/STAT3 (Starr and Hilton, 1999). On trouve également parmi ces cibles, des gènes qui s'avèrent critiques pour le maintien de la pluripotence. En effet, si leur expression est inhibée, les mESCs se différencient. Parmi eux, se trouvent les gènes *Dax1* (pour DSS-AHC critical region on the X chromosome, gene 1) ou *NrOb1* (Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1) (Niakan and McCabe, 2005), *Eed* (Embryonic ectoderm development) (Ura et al., 2008), *c-Myc* (myelocytomatosis oncogène) et *Klf4*. La surexpression des deux derniers gènes permet aux mESCs de se maintenir en autorenouvellement en absence de LIF (Cartwright et al., 2005; Li et al., 2005). D'autres gènes, dont le rôle est moins bien documenté, sont également des cibles de STAT3 tels que *sp5* (trans-acting transcritpion factor 5)*, cyp1b1* (cytochrome p450 family 1, subfamily B, polypeptide 1) et *zfp36* (zinc finger protein 36) (Bourillot et al., 2009). Début 2013, une équipe a montré que *Gbx2* est une cible de STAT3 et aussi un facteur clef dans le maintien de l'autorenouvellement. En effet ce groupe a mis en évidence le rôle de la surexpression de *Gbx2* dans le maintien de la pluripotence des mESCs en absence de LIF. De plus, cette surexpression permet de maintenir des ESCs *STAT3 -/-* à l'état indifférencié. Ce gène est également capable de reprogrammer des EpiSCs en ESCs (Tai and Ying, 2013). Enfin, récemment, deux équipes ont publié des travaux sur une nouvelle cible de STAT3, qui semble être impliqué dans la régulation du noyau de pluripotence (Martello et al., 2013; Ye et al., 2013) : le gène *Tfcp2l1* (Transcription Factor CP2-

Like 1 aussi connu sous le nom de *Crtr-1*). Ces travaux ont conduit à la conclusion que *Tfcp2l1* est une des cibles principales de STAT3. Tout d'abord, TCFP2L1 semble avoir des caractéristiques similaires à GBX2 : il maintient les mESCs *STAT3-/-* et promeut la reprogrammation d'EpiSCs en ESCs. De plus, les cellules surexprimant ce gène ont un plus fort taux de clonogénicité que celles surexprimant *Klf4* ou *Gbx2* (Hall et al., 2009; Niwa et al., 2009; Tai and Ying, 2013). De même, lorsqu'on diminue l'expression de ce gène par un shARN, on observe que le taux de clonogénicité de ces cellules n'est plus que de 40% comparé aux taux obtenus avec des cellules traitées avec des shARNs ciblant les gènes *Klf4* ou *Gbx2* (Martello et al., 2013).

Tous ces travaux mettent en évidence que STAT3 est la clef de voute contrôlant le noyau de pluripotence. Ceci montre bien que l'activation de la voie de signalisation LIF/STAT3 est indispensable et suffisante au maintien des mESCs de souris (Niwa et al., 1998).

1.4.2.1.3 Dans les ESCs humaines

De nombreuses équipes se sont intéressées au rôle que pourrait avoir le LIF dans le maintien de l'autorenouvellement des autres ESCs de mammifères et notamment des ESCs humaines. Les résultats de ces équipes sont contradictoires. Certains montrent que cette interleukine n'a pas d'implication dans l'autorenouvellement des hESCs (Reubinoff et al., 2000; Thomson and Marshall, 1998), alors que d'autres soutiennent que le LIF aide à maintenir les hESCs humaines (Schuldiner et al., 2000). Plus récemment, cette dernière équipe a démontré que les deux composants du récepteur au LIF, LIFRβ et gp130, sont exprimés dans les ESCs de primate et que STAT3 est bien activé et fonctionnel dans ces cellules après stimulation avec du LIF humain (Daheron et al., 2004). Mais il semblerait que le LIF ne réussisse pas à activer STAT3 à un niveau suffisant et nécessaire au maintien du statut indifférencié des hESCs, bien

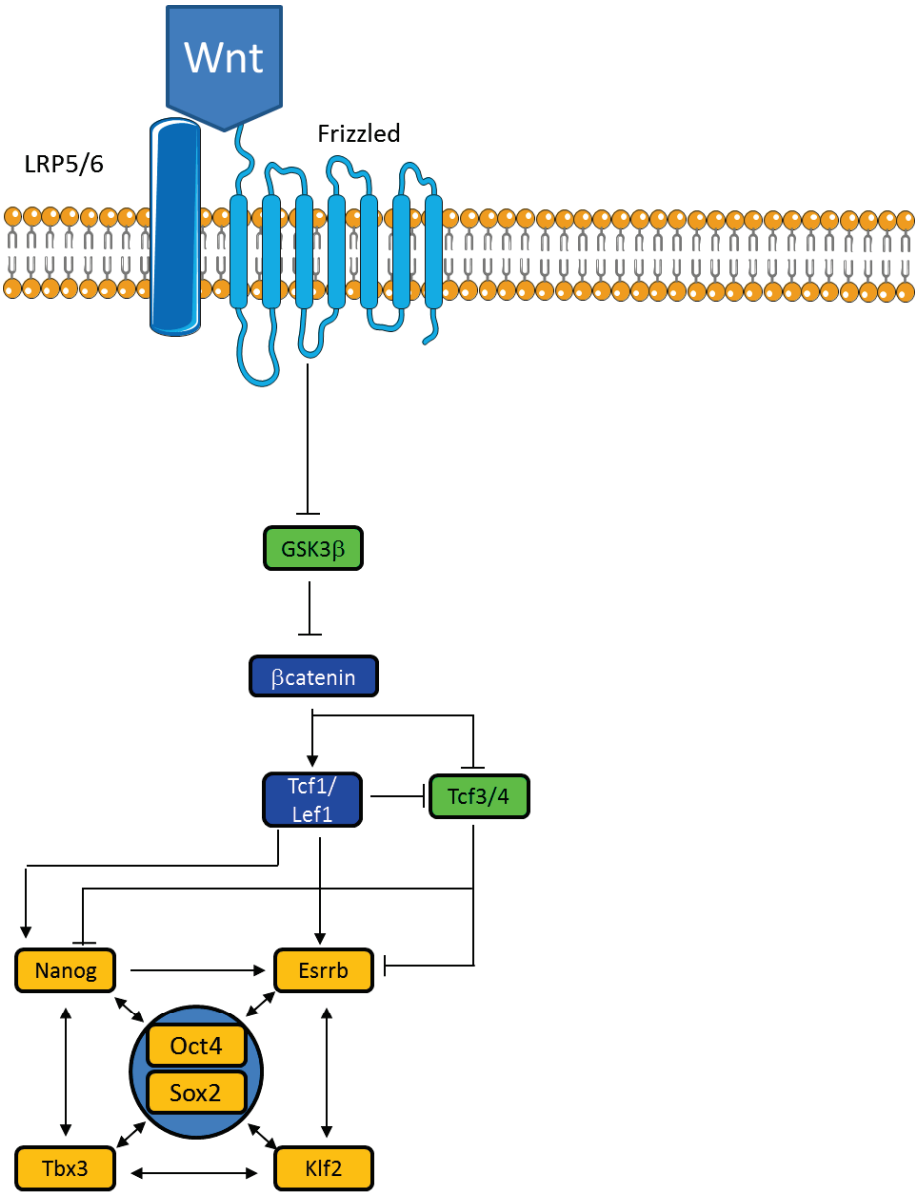


Figure 10: La voie de signalisation Wnt/βCatenin

Légende : Couleur jaune : gène du noyau de pluripotence. Couleur bleue : voies de signalisations permettant l'activation du noyau de pluripotence. Couleur verte : gènes induisant une inhibition du noyau de pluripotence

qu'il soit phosphorylé sur la tyrosine 705 et la sérine 727, car on sait par ailleurs que le niveau de STAT3 est critique dans les mESCs (Matsuda et al., 1999) De plus, les mêmes auteurs ont montré que, dans les conditions normales de culture des hESCs, c'est-à-dire en présence de FGF2, STAT3 n'est pas phosphorylé sur Y705 et très peu sur S727, ce qui a pour conséquence le maintien de STAT3 dans le cytoplasme alors qu'il est naturellement transloqué dans le noyau des mESCs lors d'une stimulation par le LIF.

1.4.2.2 La voie Wnt/βcatenin

La voie canonique de Wnt est très importante pour éliminer la GSK3β qui est un acteur clef de la destruction de la βcatenine (Sato et al., 2004). La βcatenine, quant à elle, est un facteur de transcription qui va réguler des gènes impliqués dans la pluripotence tels que les *Tcf* (Transcritpion Factor, *Tcf1, Lef1, Tcf2* et *Tcf3*) (Clevers and Nusse, 2012). Lorsque la βcatenine se fixe sur un gène *Tcf*, elle peut changer son mode de fonctionnement en passant de la répression à l'activation grâce à des coactivateurs tels que CBP (cAMP response element-binding protein) (Takemaru and Moon, 2000). Cette fonction est très importante pour le maintien des mESCs en culture, car il a été montré que *Tcf3* et *Tcf4* se fixaient sur les promoteurs de *Nanog* et *Esrrb* pour inhiber leur transcription (Martello et al., 2012; Pereira et al., 2006; Yi et al., 2008). En revanche *Tcf1* est connu pour contrecarrer en partie l'action de *Tcf3* (Yi et al., 2011) et activerait donc les gènes *Esrrb* et *Nanog* (Figure 10).

De plus, la voie Wnt est impliqué dans la mise en place de la polarité dorso-ventrale du tube neural des vertébrés. Elle semble aussi participer à la la différenciation des EpiSCs. En effet, il a été montré que l'inhibition de cette voie Wnt ou de la βcatenine elle-même permettait une culture *in vitro* plus homogène des EpiSCs présentant moins de différenciation spontanée (Sumi et al., 2013).

1.4.2.3 La voie BMP

Chez la souris, le LIF seul n'est pas capable de maintenir l'état indifférencié des ESCs en absence de sérum. Néanmoins le sérum peut être remplacé par le BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) (Figure 11, au dos). Les BMPs sont des membres de la superfamille des TGFβ. Les BMPs induisent l'expression des protéines Id (Inhibitor of differentiation)

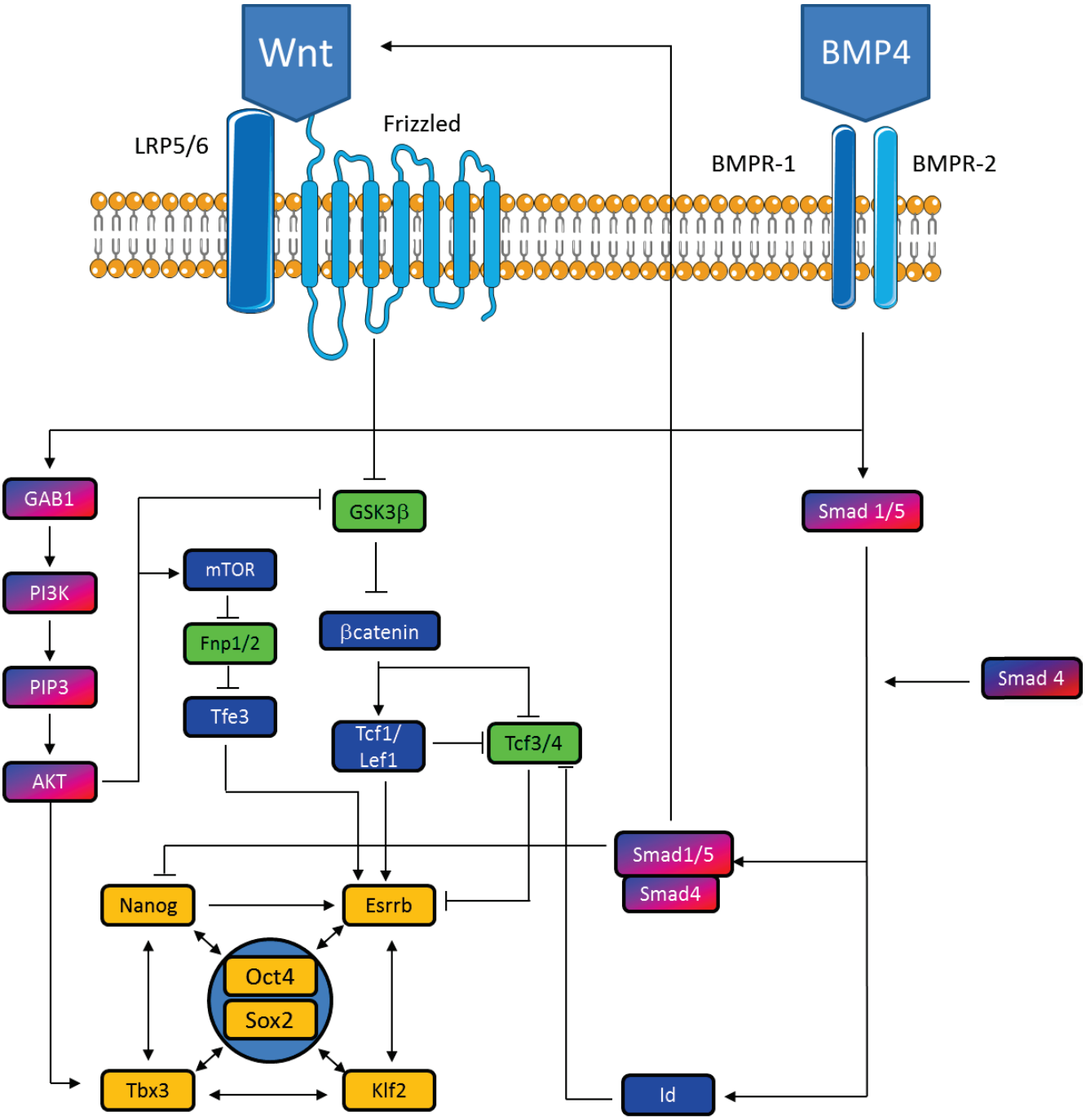


Figure 11: Les voies de signalisation du BMP4

Légende : Couleur jaune : gène du noyau de pluripotence. Couleur bleue : voies de signalisations permettant l'activation du noyau de pluripotence. Couleur verte : gènes induisant une inhibition du noyau de pluripotence. Couleur rouge : voie de signalisation impliquée dans les ESCs amorcées et les EpiSCs

(Ying et al., 2003) par le biais des protéines Smad (Homologue à *mad* (Mothers Against Decapentaplegic) et à *sma* (Small body size). Le nom est un mélange des deux homologues) et bloquent la différenciation des mESCs en ectoderme (Sirard et al., 1998). Les protéines Id est connu pour inhiber fortement *Tcf3* (Transcritpion factor 3) impliqué dans l'initiation de la différentiation neurale par son hétérodimerisation avec NeuroD (Patel and Chaudhary, 2012; Slattery et al., 2008). Ainsi, en présence de sérum qui contient du BMP4 reconnu pour bloquer la différenciation neurale (ectoderme) et de LIF qui inhibe la différenciation mésodermique et endodermique, les cellules mESCs ne peuvent pas se différencier (Ying et al., 2003).

En revanche, pour les ESCs des autres mammifères dont l'autorenouvellement est dépendant du FGF2, l'ajout de BMP4 provoque une diminution de l'expression de *Nanog* et d'*Oct4,* induisant leur différenciation en trophoblaste (Beattie et al., 2005). Cet effet est la conséquence de l'activation des protéines Smad1/5/8 (Xu et al., 2002) qui entrent en compétition avec les protéines Smad2/3, elles-mêmes activatrices de *Nanog* (Greber et al., 2010) (Figure 11). Dans ce cas, il faut éviter d'ajouter du sérum dans les milieux de culture afin de conserver l'état indifférencié des ESCs de primate.

1.4.2.4 Les voies FGF et TGFβ/Activine/Nodal

Bien que non impliquées dans l'autorenouvellement des mESCs, les voies FGF (Fibroblast Growth Factor) et TGFβ (Transforming Growth Factor beta)/Activine/Nodal sont au cœur du maintien à l'état indifférencié des EpiSC et des ESCs de primate et de lapin (Honda et al., 2008, 2009; Thomson et al., 1995). En effet, l'ajout de FGF2 (ou basic FGF - bFGF) permet aux hESCs de se développer de façon clonale, c'est-à-dire à partir d'une suspension unicellulaire (Amit et al., 2000). L'ajout de FGF2 ne remplace pas, cependant, l'utilisation de cellules nourricières. Ce fait s'explique par l'effet stimulant du FGF2 sur les cellules nourricières pour qu'elles produisent de l'Activine A (Greber et al., 2007). Le FGF2 stimule donc indirectement la voie TGFβ/Activine/Nodal qui va activer *Nanog* par l'intermédiaire des protéines Smad2/3 (Greber et al., 2010; James et al., 2005; Vallier et al., 2005). Il est également responsable de l'inhibition de BMP4 et des Smad1/5/8 par l'activation de CER1 (Cerberus) et GREM1 (Gremlin), ce qui évite la différenciation des cellules (Greber et al., 2007).

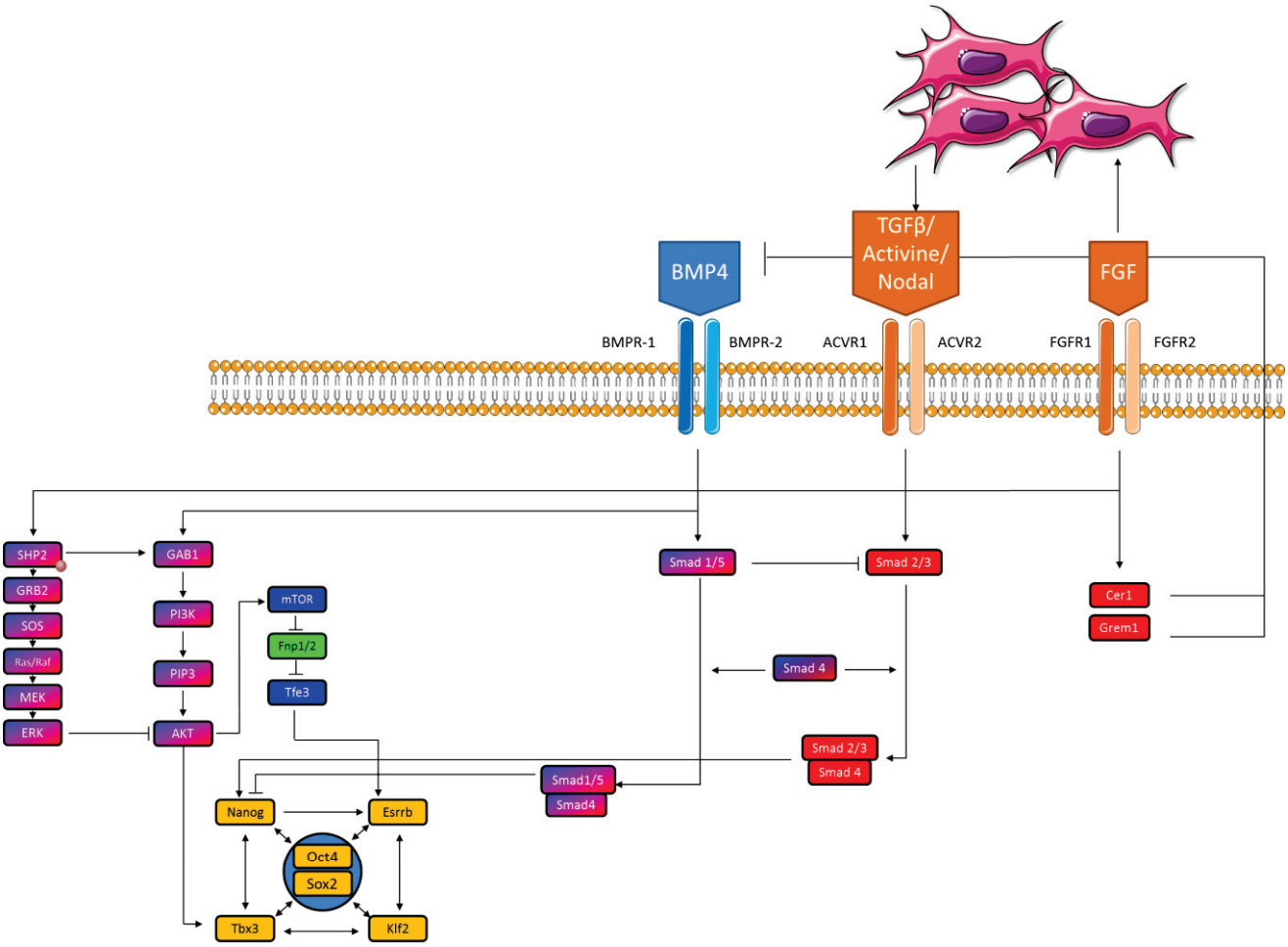


Figure 12: Les voies de signalisation FGF et TGFb/Activine/Nodal

Légende : Couleur jaune : gène du noyau de pluripotence. Couleur bleue : voies de signalisations impliquées dans les ESCs naïves. Couleur verte : gènes induisant une inhibition du noyau de pluripotence. Couleur rouge : voie de signalisation impliquée dans les ESCs amorcées et les EpiSCs

De plus, il faut noter que les membres de la famille des FGFs ont pour cible la voie des MAP-K, impliquée dans la différentiation des mESCs mais responsable de la prolifération de nombreuses autres cellules (Thisse and Thisse, 2005). De manière générale il a été montré que la voie FGF était conservée entre les EpiSC et les hESC (Greber et al., 2010) (Figure 12).

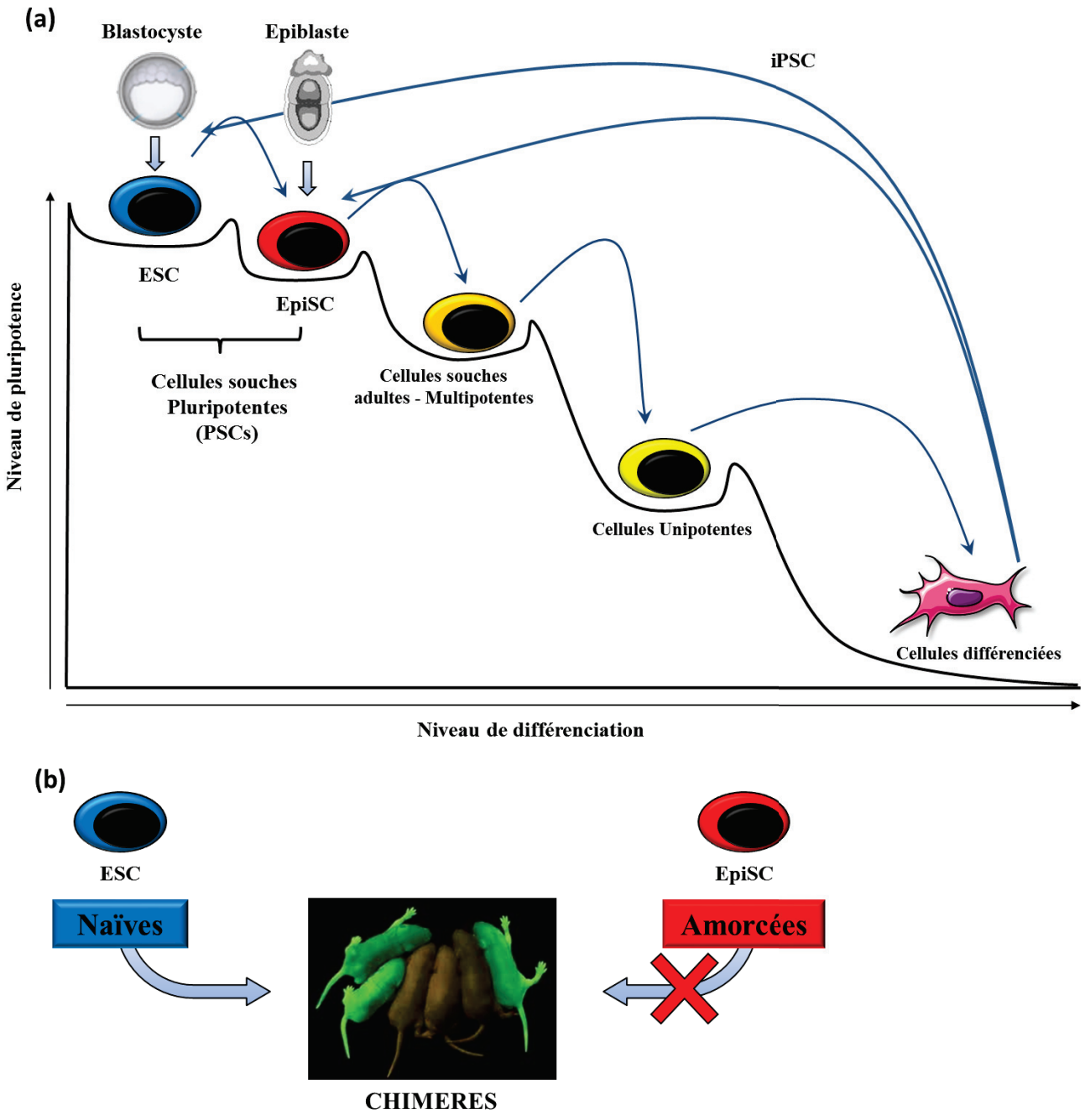


Figure 13: Les différents niveaux de pluripotence

(a) Ce graphique représente le niveau de pluripotence des différents types de cellules souches. Chaque « cuvette » représente un état de stabilité. Il est possible de reprogrammer des fibroblastes et de les stabiliser à l'état EpiSC ou ESC selon le milieu choisi.
(b) La capacité des PSCs à donner des chimères germinales est la principale caractéristique qui définit leur statut. Si les cellules sont stabilisées au sein de la cuvette des EpiSC, elles ne sont plus capables de coloniser un embryon.

1.5 Les différents niveaux de pluripotence

1.5.1 Les ESCs naïves versus amorcées

1.5.1.1 Définition

La notion de PSCs naïves et amorcées a été introduite par Austin Smith afin de discriminer deux états de pluripotence (« stemness » en anglais) très différents (Nichols and Smith, 2009), représentés d'une part par les mESCs et d'autre part par les EpiSCs. La Figure 13a représente les différents niveaux de différenciation en fonction des niveaux de pluripotence. Nous avons vu précédemment que même s'il est possible de dériver des cellules à partir d'ICM chez de nombreuses espèces, seules les ESCs de rongeur sont capables de s'intégrer dans un blastocyste et de donner naissance à un individu chimère. De plus les cellules EpiSC, dérivées à partir d'un embryon murin à un stade plus tardif post-implantatoire, sont incapables de remplir cette fonction (Figure 13b). Ceci est la principale différence discriminatoire de ces deux états : les cellules capables de former un individu chimère sont appelées « naïves » alors que les autres sont dites « amorcées » (« primed » en anglais).

1.5.1.2 Les ESCs naïves

Les ESCs naïves n'existent que chez la souris et le rat (une nouvelle exception). Elles expriment plus fortement *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Klf4*, *Klf2*, *Rex1*, *Dax1, Fgf4, Esrrb, FbxO15* et *Cdh1* (Bao et al., 2009; Nichols and Smith, 2009; Tesar et al., 2007). Elles ont également un fort taux de clonogénicité, c'est-à-dire qu'elles prolifèrent très bien lorsqu'elles sont cultivées à faible densité, à partir de suspension unicellulaire. Comme nous le verrons plus tard, un autre point important est le statut des deux chromosomes X des ESCs naïves femelles ; elles n'ont pas de chromosome X inactivés (voir chapitre 1.6.4.2). Leur prolifération est maintenue par le LIF et le BMP4 ainsi que la voie Wnt/βcatenine. Ces cellules expriment fortement la phosphatase alcaline (un marqueur de forte prolifération cellulaire) (Nichols and Smith, 2009).(Figure 14).

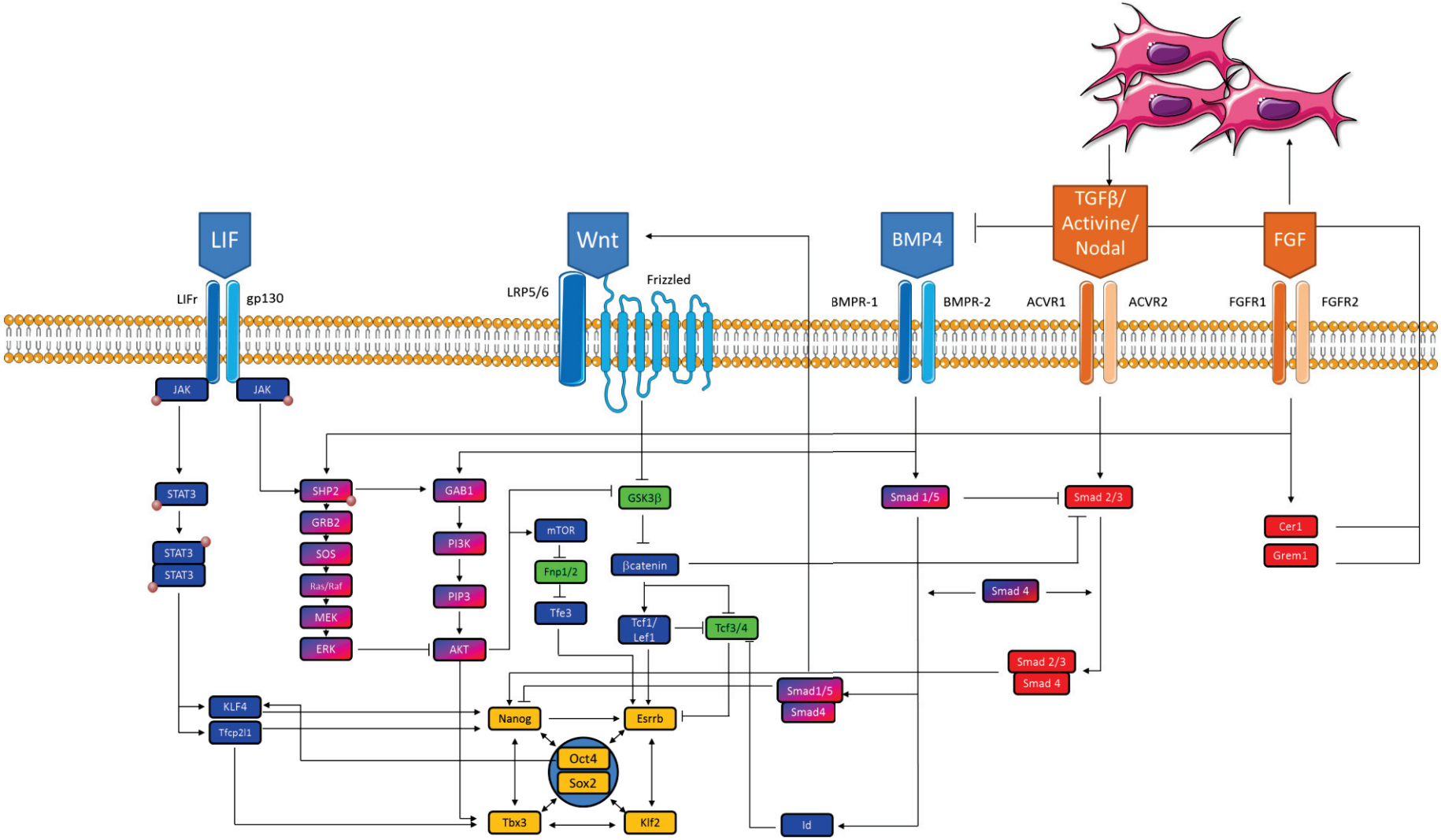


Figure 14: Les voies de signalisation impliquées dans le maintien de la pluripotence.

Légende : Couleur jaune : gène du noyau de pluripotence. Couleur bleue : voies de signalisations permettant l'activation du noyau de pluripotence chez les ESC naïves. Couleur rouge : voies de signalisations permettant l'activation du noyau de pluripotence chez les ESC amorcées. Couleur verte : voies de signalisation entraînant l'inhibition des gènes du noyau de pluripotence.

1.5.1.3 Les ESCs amorcées

Contrairement aux cellules naïves, les cellules amorcées ne colonisent pas un embryon précoce pour donner des chimères. Les EpiSC de souris constituent le modèle de référence de cette catégorie de cellules pluripotentes. Elles expriment moins fortement *Oct4, Nanog* et *Sox2* et très faiblement *Klf2* et *Klf4*. Des gènes de différenciation tels que *Fgf5* et *T-Bra* sont exprimés alors que les marqueurs de pluripotence (*Rex1, Dax1*, etc…) ne sont pas exprimés. Elles prolifèrent très mal en suspension unicellulaire et n'ont qu'un seul chromosome X actif dans le cas des lignées femelles. Leur prolifération est maintenue en réponse au FGF et à l'Activine (Figure 14). Elles n'expriment pas la phosphatase alcaline (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007).

Il faut noter que les ESCs des autres mammifères tels que les primates, le lapin, le bovin sont souvent qualifiées d'amorcées, du fait qu'elles ne colonisent pas un embryon receveur. Ces cellules semblent, en effet, plus proches de ce statut bien que, contrairement aux EpiSCs, elles expriment la phosphatase alcaline et, comme nous le verrons plus tard, partagent des propriétés avec les ESCs de souris.

1.5.1.4 Un état intermédiaire

Depuis peu un article a été publié concernant un état intermédiaire entre les ESCs naïves et EpiSC amorcées chez la souris (Chang and Li, 2013). Ce papier rapporte pour la première fois l'établissement de lignées stables intermédiaires entre les stades naïf (mESCs) et amorcé (EpiSCs), nommées IESCs (Intermediate Embryonic Stem Cells). L'autorenouvellement de ces cellules est contrôlé par la voie Activine/Smad 2/3 mais elles restent sensibles au LIF. En effet, lorsqu' on ajoute du LIF dans leur milieu de culture, les IESCs sont capables de se stabiliser au stade ESC et de coloniser un blastocyste. Si on les remet en présence de FGF2, ces cellules se redifférencient au stade EpiSC. Les IESCs expriment faiblement *Rex1* (marqueur naïf) et *Otx2* (marqueur amorcé) tandis qu'elles expriment fortement *Pecam1* (marqueur naïf) et *Pitx2* (marqueur amorcé). Cette étude montre que les premiers stades de différenciation des cellules se font graduellement dans l'embryon, et que les étapes clefs de cette différenciation peuvent être capturées et stabilisées *in vitro*. Il est possible que les ESCs des autres mammifères soient stabilisées à un stade plus proche de celui des IESCs que dse celui des EpiSC.

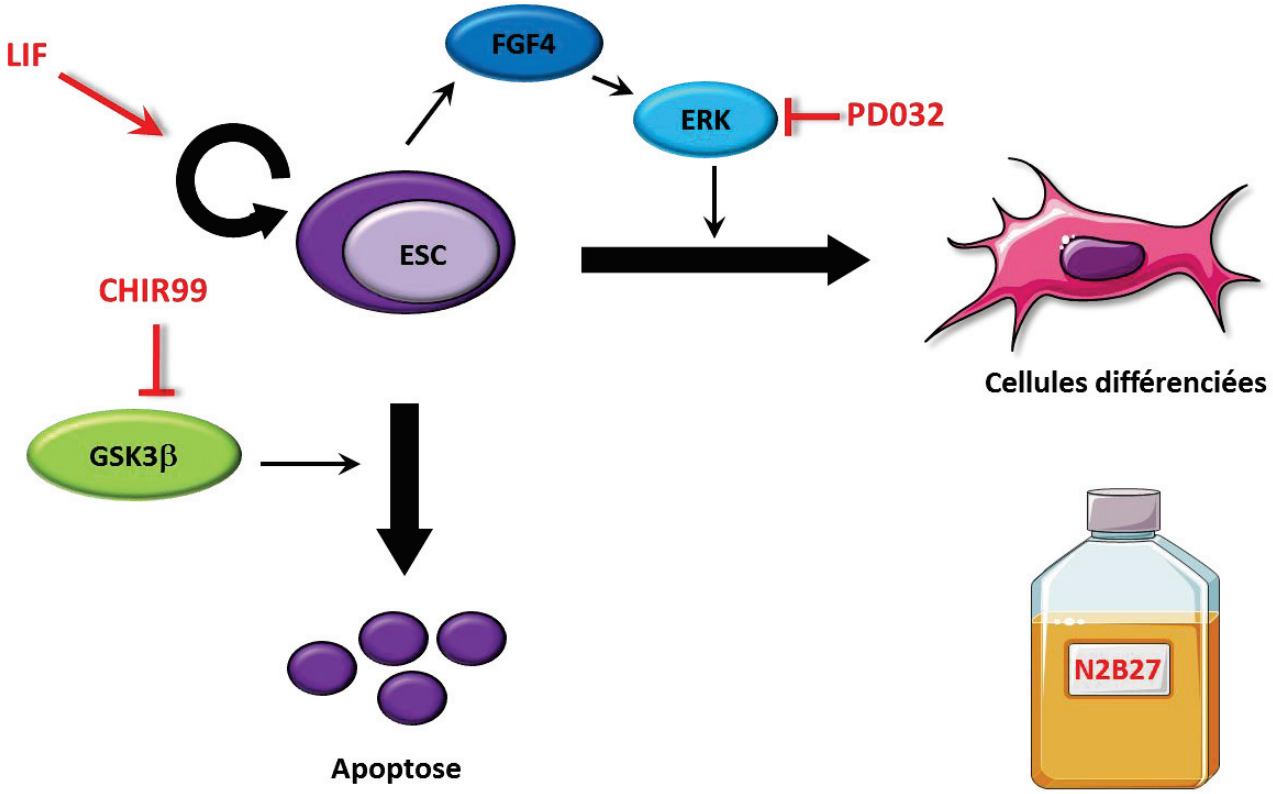


Figure 15: La condition 2i/LIF

Schéma représentant le rôle du milieu N2B27 supplémenté des deux inhibiteurs, PD0325901, inhibiteurs de ERK (voie des MAP-K), permettant d'inhiber la différenciation des cellules, de CHIR099021, inhibiteurs de la GSK3β, permettant de mimer l'action de la voie Wnt/βCatenin, et donc d'améliorer la survie cellulaire, et du LIF.

1.5.2 L'état fondamental de pluripotence

1.5.2.1 Définition

Depuis le début du 20ème siècle, les scientifiques cherchent à comprendre les premières étapes du développement embryonnaire et à définir l'état fondamental de pluripotence. La dérivation et la culture *in vitro* de PSCs sont des outils indispensables pour comprendre les bases moléculaires des premières étapes de différenciation du développement embryonnaire. Cependant, il faut s'assurer que les PSCs cultivées sont proches des cellules embryonnaires et représentent bien le même état de pluripotence. En effet, la dérivation d'ESCs correspond à la capture de l'état de pluripotence des cellules embryonnaires, mais cet état peut aussi résulter de l'adaptation de ces cellules à leur nouvel environnement *in vitro*. Nous avons observé précédemment que chez la souris, différents types de PSC peuvent être obtenus à partir de différents stades du développement embryonnaire (ESC, IESC et EpiSC). Ces cellules utilisent des voies de signalisation différentes pour maintenir leur état indifférencié en culture. Ainsi les différences observées dans les voies de signalisation des PSCs ne sont pas dues qu'à une différence d'espèce, mais à une stabilisation des cellules à différents niveaux de pluripotence.
L'état fondamental de pluripotence a été défini, encore une fois, par l'équipe d'Austin Smith (Ying et al., 2008). Leur objectif était de définir des conditions de culture plus contrôlées que celles employées jusque-là pour l'entretien des mESCs et basées sur l'utilisation de FBS (sérum de veau fœtal) (Figure 15). Or le FBS étant un produit naturel, sa composition peut varier et inclure des agents stimulant la différenciation cellulaire. De plus, le simple remplacement du sérum par du BMP4 ne suffisait pas à contrôler les conditions de culture, car les ESCs sécrètent de manière autocrine le facteur FGF4, qui stimule la voie des MAPKs et entraîne leur différenciation (Kunath et al., 2007). Afin de pouvoir contrer ce phénomène, l'équipe d'A. Smith a utilisé un milieu de culture stringent et défini, le N2B27, dans lequel ont été ajouté deux inhibiteurs, le PD0325901 et le CHIR099021. Le PD0325901 est un inhibiteur d'ERK, un des acteurs de la voie des MAPKs, il bloque la différenciation des cellules (bien que si on élimine cet inhibiteur du milieu elles conservent leur capacité de pluripotence), mais provoque leur apoptose. Le CHIR099021 est un inhibiteur de GSK3β qui a pour effet de stimuler la voie Wnt, de promouvoir l'autorenouvellement et d'éviter que les cellules n'entrent en mort cellulaire programmée (Figure 15) (Ying et al., 2008).

Ces nouvelles conditions de culture ont permis d'obtenir des ESCs de rat capables de coloniser un blastocyste (Buehr et al., 2008; Li et al., 2008), ainsi que des lignées d'ESC

provenant de souches de souris qui n'étaient pas permissives à la dérivation de cellules naïves (Kanda et al., 2012). Ce milieu appelé « 2i/LIF » a donc suscité de nombreux espoirs quant à la dérivation de lignées d'ESC naïve chez les autres espèces de mammifères.

1.5.2.2 L'état fondamental de pluripotence chez les autres mammifères

De nombreuses équipes de recherche, de par le monde, cherchent à obtenir des ESCs de mammifère naïves. Très peu y sont parvenues. Actuellement, le travail le plus intéressant sur ce sujet concerne celui de l'équipe du R. Jaenisch (Hanna et al., 2010a). En effet, cette équipe a obtenu la réversion de lignées d'ESC et iPSC humaines dans les conditions 2i/LIF, jusqu'à un statut proche de celui des ESCs de souris. Les cellules obtenues ont montré une augmentation de l'expression de gènes caractéristiques de l'état naïf tels que *Klf2, Gbx2, Klf4* et *Tbx3*. Mais pour atteindre ce résultat, la surexpression stable des gènes *Klf4* et *Oct4* s'est avérée être indispensable. Un résultat similaire a été obtenu par l'équipe de A. Ogura sur des iPSCs de lapin. Ce groupe a obtenu des cellules s'autorenouvellant en condition 2i/LIF et colonisant le blastocyste de lapin – propriété ne pouvant être vérifié sur les cellules humaines précédentes en raison de problème bioéthique évident – , donc présentant un statut naïf, en surexprimant le gène *Oct4* humain (Honda et al., 2013). Il faut noter qu'il n'y a pas de publications relatant l'obtention d'ESCs naïves chez les autres mammifères, sans insertion au préalable de transgènes permettant de surexprimer des gènes clefs de la pluripotence.

En ce qui concerne les ESCs de souris, il a toutefois été montré que des cellules STAT3-/- étaient capables de se maintenir en condition 2i/LIF (Ying et al., 2008), ce qui n'est pas le cas des cellules βcatenine -/- (Wray et al., 2011). En effet, le rôle d'un des inhibiteurs de cette condition, le CHIR099021, est d'inhiber GSK3β et ainsi de permettre l'activation de la βcatenine. Ceci montre bien que les deux voies de signalisation agissent de manière indépendante et qu'elles sont chacune capable de maintenir l'autorenouvellement. La voie Wnt, par l'intermédiaire d'*Esrrb*, confère aux ESCs une indépendance au LIF pour le maintien de la pluripotence, tandis que des cellules présentant une inhibition de l'expression d'*Esrrb* peuvent s'autorenouveller en présence de LIF (Lyashenko et al., 2011; Wray et al., 2011). *Esrrb* est un des marqueurs principaux de l'état fondamental de pluripotence.

1.5.2.3 La culture des embryons en condition 2i/LIF

La culture des embryons en condition 2i/LIF, permet d'augmenter la proportion de cellules exprimant NANOG par rapport aux cellules exprimant GATA4, ce qui a pour conséquence l'accroissement du nombre de cellules de l'épiblaste comparé à l'hypoblaste (Nichols et al., 2009). C'est la culture des embryons en milieu 2i/LIF qui a permis de dériver des ESCs chez le rat (Li et al., 2008) et les souches de souris non permissives à la dérivation d'ESC (Kanda et al., 2012). En revanche, lorsque ce même protocole est appliqué aux embryons humains, il y a bien une augmentation du nombre de cellules exprimant NANOG mais pas d'amélioration du taux et de l'état de pluripotence des hESCs dérivées (Van der Jeught et al., 2013).

1.5.2.4 Des états fluctuants

Récemment de nombreuses équipes ont démontré, grâce à des expériences de RT-qPCR sur cellules uniques, que les PSCs pouvaient présenter des signatures moléculaires différentes. Il s'avère donc qu'au sein d'une même culture, les cellules sont hétérogènes et présentent différents états de pluripotence. Chaque cellule ne serait pas stable mais fluctuerait d'un état de pluripotence à un autre. Plusieurs arguments vont dans ce sens.

Premièrement, les ESCs ne sont pas strictement similaires aux cellules de l'ICM. L'expression d'*Oct4* diminue entre l'ensemencement en culture des cellules de l'ICM et l'apparition des excroissances cellulaires lors de la première étape de dérivation des ESCs. Ensuite après le premier passage, elle reste stable tout au long de la culture *in vitro* (Buehr and Smith, 2003; Rossant, 2001). Il est possible de stabiliser une plus forte expression d'*Oct4* en ajoutant l'inhibiteur PD098059 (un autre inhibiteur de la voie des MAPKs) dans la culture des excroissances. L'environnement s'avère donc critique pour le maintien de la pluripotence des PSCs.

Deuxièmement, il a été montré qu'une sous-population de mESC était capable, sous l'action d'un transposon rétroviral (ERV), de présenter un transcriptome proche de celui des cellules d'un embryon au stade 2-cellules. En effet, lorsqu'on injecte les cellules de type « 2-cellules » dans un embryon, elles contribuent à la formation des tissus embryonnaires et extra-embryonnaires du fœtus chimère (Macfarlan et al., 2013). Au sein des cultures d'ESC de souris, on trouve donc des cellules pluripotentes et totipotentes.

Troisièmement, il a été montré qu'une hétérogénéité cellulaire est également présente dans les cultures de cellules EpiSC de souris. En analysant l'activité de l'enhancer d'*Oct4*, il a été montré que les cellules fluctuaient entre deux stades : un stade où les cellules expriment fortement *Oct4* et un autre où elles ne l'expriment que très peu. Dans l'embryon, deux enhancers différents régulent l'expression du gène *Oct4,* l'enhancer proximale (PE) est spécifique des cellules de l'épiblaste et l'enhanceur distal (DE) est caractéristique des cellules de l'ICM. Dans les cultures d'EpiSC, c'est le PE qui contrôle principalement l'expression d'*Oct4* dans les cellules présentant une forte expression, mais une faible activité du DE a aussi été mise en évidence dans ces mêmes cellules (Han et al., 2010a). De plus il a été montré que lorsqu'on cultive des EpiSCs dans les conditions de culture des mESCs, une fraction d'entre elles est capable de se convertir en ESCs (Bao et al., 2009). Or ce sont les cellules ayant l'expression d'*Oct4* contrôlée par le DE qui sont capable de réaliser cette réversion en mESC. Il s'avère donc que les EpiSCs exprimant fortement *Oct4* ne sont pas des cellules mESCs, mais sont celles qui le deviendront si on induit la réversion. Les cellules exprimant fortement Oct4 sont proches du stade de développement E5.5 (epiblaste précoce) tandis que les autres ont un transcriptome similaire au stade de développement embryonnaire E6.5 (épiblaste tardif). Enfin, ces cellules EpiSC particulières (de type E5.5) sont capables de participer au développement embryonnaire et donc de produire des embryons chimères (Han et al., 2010a).

Ces études ont permis de souligner un aspect important de la culture des PSCs. Les cellules sont hétérogènes et fluctuent d'un état à un autre constamment durant la culture. Tous ces résultats nous amène à penser qu'il pourrait exister, au sein des cultures de PSCs de mammifère autre que les rongeurs, des évènements rares (par exemple des cellules à l'état naïf voir totipotent), qu'il serait possible d'isoler afin de pouvoir les stabiliser *in vitro* et les amplifier. Ces cellules pourraient être des cellules capables de coloniser un embryon de lapin ou de singe.

1.6 Les caractéristiques principales des cellules pluripotentes naïves et amorcées

1.6.1 La culture des PSCs

1.6.1.1 La morphologie

Les PSCs ont une morphologie particulière et unique en culture. Elles sont petites, rondes et avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Le noyau représente environ 80% du volume total de la cellule. Les cellules prolifèrent en colonies. Des différences entre cellules de souris et celles des autres mammifères au niveau de l'aspect des colonies sont notables. Les colonies d'ESC de souris forment des dômes en 3 dimensions alors que les cellules des autres espèces forment des colonies plates. A l'intérieur de ces colonies les cellules sont très serrées, il est quasiment impossible de les distinguer les unes des autres.

1.6.1.2 Méthodes de passage cellulaire

Les protocoles de culture apparaissent comme vraiment importants pour maintenir à l'état indifférencié les différents types de PSCs. Pour réaliser les passages cellulaires, il est nécessaire de dissocier les cellules afin de les ensemencer dans un nouveau puits de culture. Pour les cellules de rongeurs, il est possible de dissocier les cellules par l'action d'une enzyme de manière à obtenir une suspension unicellulaire (on utilise de la trypsine ou de l'accutase), alors que pour les autres ce type de dissociation s'avère inefficace. En effet, les PSCs des autres mammifères ayant un faible taux de clonogénicité par rapport aux cellules de rongeurs, il est indispensable de ne pas les dissocier lors de passages cellulaires mais de découper des petits amas de cellules après action d'une collagénase, pour les déposer dans les nouveaux puits de culture.

1.6.1.3 Les cellules nourricières

Les ESCs ont besoin lors de leur dérivation de cellules nourricières. Ces cellules sont, dans la majorité des cas, des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), provenant généralement des lignées de souris CD1, CF1 ou OF1. Il est très important de stopper la croissance de ces cellules, car malgré le fait que ce soit des fibroblastes, ce sont des cellules qui

prolifèrent encore beaucoup, et qui pourraient à terme, prendre la place des ESCs dans les boîtes de culture. Dans ce but deux protocoles existent : l'arrêt par irradiation ou l'ajout de Mytomycine C, agent alkylant qui va créer des ponts dans l'ADN et ainsi empêcher la réplication des cellules. Ces cellules ont un réel impact sur le maintien des ESCs à l'état indifférencié. De plus, les ESC de chaque espèce se développent avec des concentrations de cellules nourricières différentes ($5{,}4.10^4$ cellules/cm² pour les mESCs R1 et $2{,}5.10^4$ cellules/cm² pour les hESCs H9 par exemple). Si ces concentrations sont modifiées, les ESCs peuvent se différencier. Même pour les autres espèces, les fibroblastes de souris, en comparaison avec les fibroblastes de leur propre espèce, s'avèrent être les cellules les plus efficaces pour la dérivation. Il est toutefois possible de dériver et de cultiver des hESCs sur des fibroblastes de prépus humain (Hovatta, 2003).

1.6.1.4 Les facteurs de croissance

Les cellules nourricières sont nécessaires mais ne sont pas suffisantes. Les ESCs ont besoin de facteurs de croissance capables d'activer, par différentes voies de signalisation, les gènes de pluripotence indispensables à leur maintien à l'état indifférencié. Ces facteurs varient entre les ESCs murines et les ESCs des autres espèces. Les ESCs murines sont dépendantes de la cytokine LIF qui peut entièrement remplacer l'utilisation de cellules nourricières (Smith et al., 1988; Suda et al., 1987). En revanche, les ESCs des autres espèces sont dépendantes du facteur de croissance FGF2 (Xu et al., 2005). L'ajout de FGF2 dans le milieu de culture ne permet pas, cependant, de supprimer l'utilisation des cellules nourricières.

1.6.1.5 Le milieu de culture

La composition du milieu de culture est aussi une différence qui sépare les ESCs murines des ESCs des autres espèces de mammifères. Les ESCs de souris se cultivent en présence de FBS alors que les autres ESCs se cultivent en présence de Knock-Out Serum Replacement (KO-SR). Comme nous l'avons vu précédemment, cette différence est due à l'effet du facteur BMP4 présent dans le sérum sur les ESCs. Le BMP4 est nécessaire au maintien en autorenouvellement des ESCs murines dépendantes du LIF et peut remplacer l'ajout de sérum dans le milieu (Ying et al., 2003). En revanche, le BMP4 induit la

différenciation des autres ESCs dépendantes du FGF2 (Beattie et al., 2005) et ce qui justifie donc l'utilisation de KO-SR qui n'en contient pas.

1.6.1.6 La phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (PA) est une enzyme que l'on retrouve en très grande quantité dans les tissus capables de se régénérer tels que le foie, ou dans les tissus en forte croissance comme le squelette des enfants. Elle est caractéristique des cellules ayant un fort potentiel d'autorenouvellement. C'est un des premiers marqueurs testés lors de la caractérisation des ESCs (Reubinoff et al., 2000). Cependant cette enzyme n'est pas exprimée dans les EpiSCs (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007), bien qu'elle soit exprimée dans les PSCs des autres espèces de mammifères (Honda et al., 2008; Thomson et al., 1995)

1.6.1.7 Les marqueurs membranaires

Les marqueurs membranaires sont des protéines ou des sucres qui sont spécifiques aux deux types de cellules, naïves et amorcées. les mESCs expriment fortement le marqueur de surface SSEA1 (Knowles et al., 1978), tandis que les ESCs humaines et simiennes expriment SSEA3 et SSEA4. D'autres marqueurs sont spécifiques des ESCs de primates tels que Tra1-60, Tra1-81 et CD90 (Thy-1). En revanche, dans ce cas-là, les EpiSCs sont différentes des ESCs de primates car elles expriment fortement SSEA1 (Brons et al., 2007). Ce marqueur pourrait être spécifique de l'espèce souris.

1.6.1.8 La stabilité génétique des lignées

Après dérivation, les ESCs ont un caryotype normal et stable. En revanche, au fur et à mesure de passages cellulaires en culture, de nombreuses mutations se mettent en place (Bai et al., 2013). Au sein des hESCs, il a été montré que ces altérations se produisent souvent sur les mêmes chromosomes : les chromosomes 12, 17, 20 et X (Amps et al., 2011; Draper et al., 2004; Lefort et al., 2008). Ces altérations sont en général des augmentations du nombre de copie de portion de ces chromosomes. Pour le chromosome 20, il s'agit de la portion 20q11.21 (plus de 20% des 125 lignées analysées). Au sein de ce fragment se trouvent, entre autres, les gènes codant pour BCL2L1 et ID1 (Amps et al., 2011). BCL2L1 est connu pour inhiber l'apoptose et

ID1, comme nous l'avons déjà vu, empêche la différentiation en ectoderme et en mésoderme. Les cellules subissant des mutations sur ce locus ont un avantage de croissance considérable en culture, et vont donc, de ce fait, être sélectionnées au cours des passages successifs. Ces modifications entrainent donc une augmentation de la prolifération des cellules, elles deviennent de moins en moins sensibles aux facteurs extérieurs ; ce qui en fait des cellules quasi malignes (Ben-David and Benvenisty, 2011). Les cellules dont on effectue les passages grâce à une dissociation enzymatique présentent plus de mutations que les cellules passées en amas. En effet, en comparaisons des cellules passées en amas, les cellules isolées ayant un avantage de prolifération prennent plus facilement le pas sur les autres.

L'intégrité du génome est cruciale pour les futurs traitements basés sur les PSCs, ainsi que pour la production d'animaux chimères. En effet, si les cellules ont trop de mutations il sera impossible d'obtenir des animaux viables ou une transmission germinale.

1.6.2 Le cycle cellulaire

1.6.2.1 Les différentes phases du cycle

Le cycle cellulaire est composé de 4 phases. La première est la phase G1, lors de laquelle la cellule va choisir entre sortir du cycle, c'est-à-dire s'orienter vers la différenciation, la quiescence ou encore l'apoptose, ou continuer de cycler. Ensuite, si elle continue son cycle, elle entre en phase S, phase de réplication de l'ADN jusqu'à la phase G2, phase de croissance cellulaire. Lorsque l'ADN est dupliqué (4n), elle entre en phase de mitose qui est composée de la prophase, de l'anaphase, de la métaphase et enfin de la télophase. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans les transitions entre ces différentes phases. Le cycle cellulaire dépend de l'activité de complexes composés de 2 sous-unités : une unité catalytique représenté par les kinases cyclines dépendantes (Cdks) et des unités régulatrices, les cyclines. Les cyclines sont exprimées à différents moments du cycle cellulaire (le nom cycline vient du fait que ces protéines sont exprimées de manière cyclique) et vont réguler les Cdks. Par exemple, le passage de la phase G1 à la phase S se fait grâce aux complexes actifs Cycline D/Cdk4/6 et Cycline E/Cdk2 alors que la transition entre les phases S et G2 est régulée par le complexe Cycline A/Cdk2. Les complexes Cycline A et Cycline B avec Cdk2 entraînent l'entrée en mitose de la cellule (transition G2/M). Tous ces complexes sont régulés négativement par des inhibiteurs

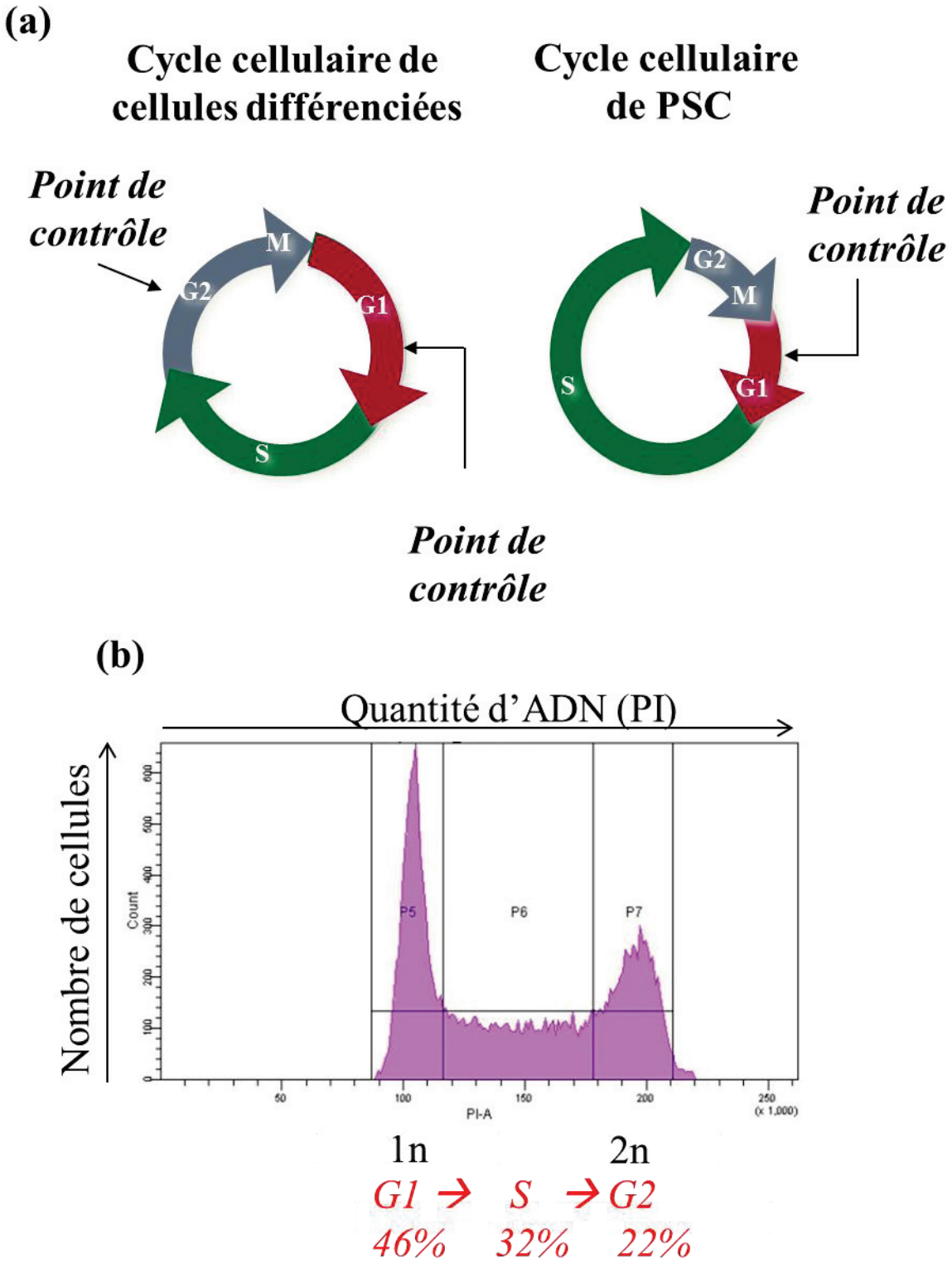


Figure 16: Le cycle cellulaire

(a) Les différents profils de cycle cellulaire entre des cellules pluripotentes et différenciées.
(b) Analyse du cycle cellulaire au FACS (Fluorescence-activated cell sorting) par révélation de la fluorescence d'un intercalant à l'ADN (Iodure de propidium). Il est alors possible de mesurer la proportion de cellules dans chaque phase du cycle à un instant donné

appelés CKIs (Cycline Kinase Inhibitors) composés de deux familles de protéine : la famille des Cip/Kip1 et la famille des Ink4. La première famille Cip/Kip1 comprend les protéines p21Waf1, p27 et p57 qui inhibent aussi bien les Cdks que les complexes Cyclines/Cdks. La seconde famille Ink4 comprend les protéines p16Ink4a, p15Inkb, p18Inc4c et p19Inkd qui répriment spécifiquement l'activité de Cdk4 et Cdk6 en empêchant leur association avec la cycline D. Il a été montré que les CKIs sont exprimés très faiblement dans les ESCs (Becker et al., 2006; Stead et al., 2002). En revanche, ces cellules expriment fortement Cdk2 et ce tout au long du cycle cellulaire, ce qui entraine un fort taux de prolifération cellulaire (Koledova et al., 2010; Stead et al., 2002).

1.6.2.2 Le cycle cellulaire des ESCs

1.6.2.2.1 Les particularités de la phase G1

Le cycle cellulaire des ESCs est unique et cela pour plusieurs raisons. Premièrement, il n'y a pas de point de contrôle en G1 en cas de dommages de l'ADN comme pour les cellules somatiques, donc les cellules ne peuvent s'arrêter de cycler, mais en contrepartie elles vont préférer se différencier ou entrer en apoptose (Figure 16a). Deuxièmement, il y a beaucoup plus de phénomènes de réparation du génome que dans les cellules somatiques. Enfin la fonction de p53 qui intervient dans la mise en place du point de contrôle en G1 en cas de dommages de l'ADN dans les cellules somatiques, est très différente dans les ESCs, car elle rentre en conflit avec les mécanismes de maintien de la pluripotence. Quatrièmement, il faut savoir que dans les ESCs les cyclines ne cyclent pas (excepté la cycline B qui atteint son maximum d'expression durant les phases G2/M). Elles sont exprimées constitutivement tout au long du cycle cellulaire.

Les ESCs ont un cycle plus court que les cellules différenciées, 10-12h chez les mESCs et 15-16h chez les hESCs contre 24 à 32h pour les cellules différenciées (Becker et al., 2006; Fluckiger et al., 2006; Stead et al., 2002) . Ce taux de prolifération est en partie dû à la première raison que j'évoquais, c'est-à-dire une absence du point de restriction R (Jones and Kazlauskas, 2001) dans la phase G1. Lors de la différenciation, la proportion de cellules dans la phase G1 augmente (Figure 16b). La question de savoir si ce phénomène est la cause ou la conséquence de la différenciation reste à préciser. Cependant, au sein de notre laboratoire, nous avons abordé à cette question en utilisant des mESCs de souris modifiées génétiquement pour exprimer un

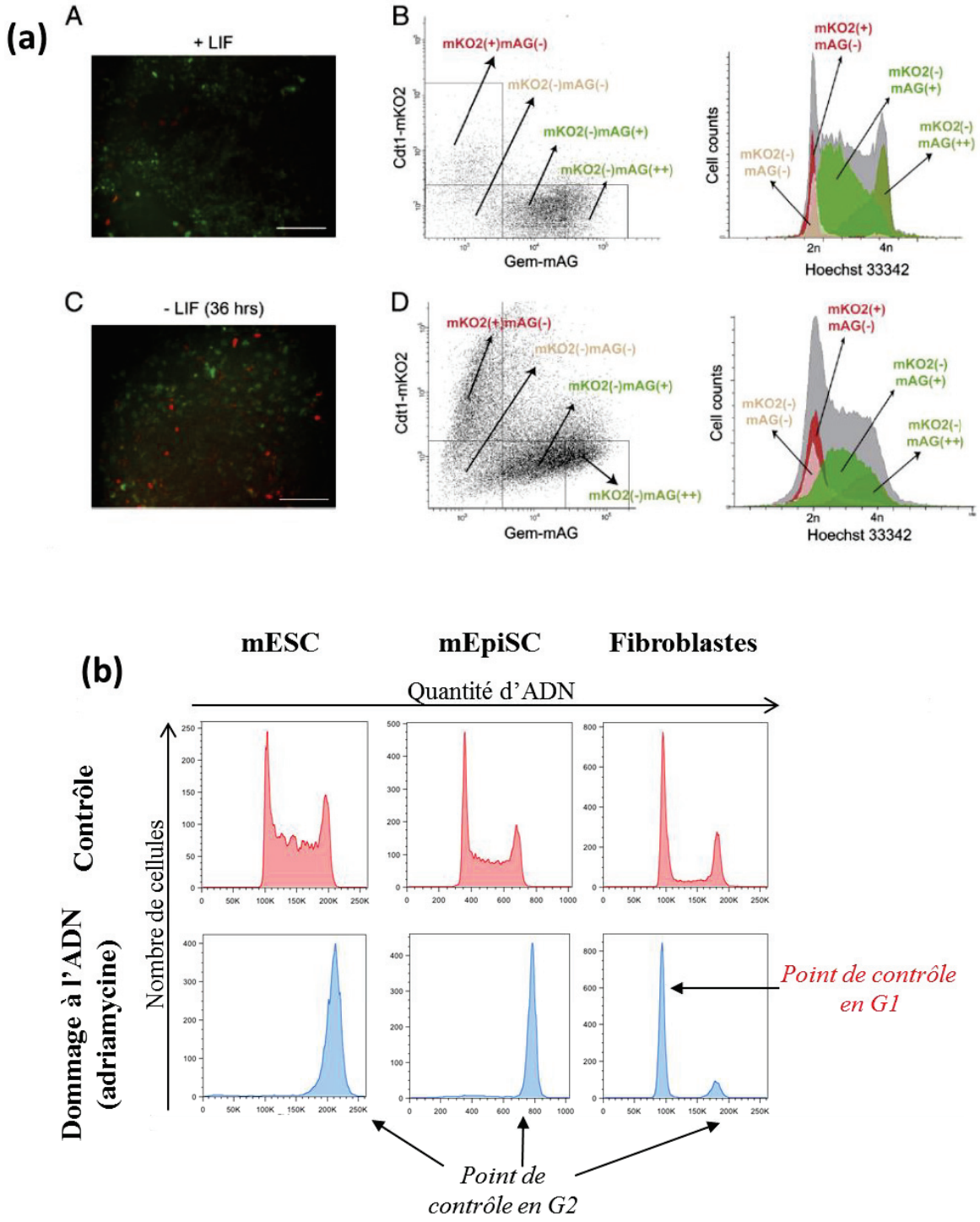


Figure 17: Analyse du cycle cellulaire

(a) Système FUCCI : A et C : aperçu des mESCs au microscope à fluorescence. B et D : Analyse au FACS de l'expression des protéines fluorescentes. A et B : cellules cultivées en présence de LIF ; Cet D : cellules privée de LIF. Lorsqu'on prive les cellules de LIF pendant 36 heures il y augmentation du nombre de cellules en phase G1 car les cellules se différencient. (Coronado et al., 2013)

(b) En rouge les cellules en conditions normales de culture, en bleu les mêmes cellules après 24h de traitement à l'Adriamycine (drogue produisant des cassures de l'ADN). Les flèches indiquent les phases du cycle cellulaire auxquels les cellules ont stoppé leur croissance.

flurochrome rouge (Kusabira Orange) lors de la phase G1 et un flurochrome vert (Azami Green) lors des phases S/G2/M (Coronado et al., 2013). Ces deux fluorochromes sont respectivement associés aux protéines Cdt1 et Geminin qui s'accumule respectivement lors des phasse G1 (Cdt1) et S/G2/M (Geminin), puis sont dégradées rapidement par ubiquitination lors du changement de phase (Figure 17c).Ce système appelé « The Fluorescence Ubiquitination Cell Cycle Indicator » (FUCCI) permet de mesurer les durées de chaque cycle et la proportion de cellules dans chaque phase (Sakaue-Sawano et al., 2008). Notre équipe a démontré que lors de la différenciation, en partant du stade fondamental de pluripotence jusqu'au stade amorcé, la durée de la phase G1 augmentait, et que les cellules en phase G1 étaient les plus susceptibles de se différencier. Ces résultats montrent que la phase G1 est une fenêtre de temps durant laquelle les cellules peuvent s'engager dans la différenciation (Coronado et al., 2013). Les hESCs semblent différentes des mESCs de par le fait que les principaux acteurs du cycle cellulaire ont une expression qui varie tout au long du cycle cellulaire sauf la cycline E. En revanche, il semblerait que le complexe Cycline E/Cdk2 soit très important pour le maintien d'un cycle cellulaire rapide et donc de la pluripotence des hESCs.

1.6.2.2.2 Le point de contrôle en phase G2

Nous avons vu que les ESCs n'ont pas de point de restriction contrôlé par p53 en réponse aux dommages à l'ADN en phase G1. Cependant il existe un autre point de contrôle, régulé par Cdc25A (Cell division cycle). Cdc25A a un rôle bien défini dans la transition G1/S, il est impliqué dans déphosphorylation et l'activation de la kinase Cdk2 (Blomberg and Hoffmann, 1999; Galaktionov and Beach, 1991). Mais il est aussi impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 par des mécanismes indépendants de p53. En effet, lors de dommages à l'ADN, un senseur, appelé Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein (ATR), va phosphoryler Chk1, qui va à son tour inhiber Cdc25A et activer Wee1, respectivement activateur et inhibiteur de Cdk2. Ceci va alors conduire à une diminution de Cdk2, et un arrêt en phase G2/M (Xiao et al., 2003), car la transition entre les deux phases est régulée par le complexe Cycline A/Cdk2. Lorsque l'on traite des mESCs, des EPiSC et des fibroblastes avec de la Doxorubicine (Adryamicin®), un intercalant de l'ADN, va créer des cassures dans les hélices double brins de l'ADN et bloquer leur réplication, seul les fibroblastes possèdent deux points de contrôle du cycle cellulaire (Figure 17b). Les cellules pluripotentes ont perdu le point de contrôle de la phase G1.

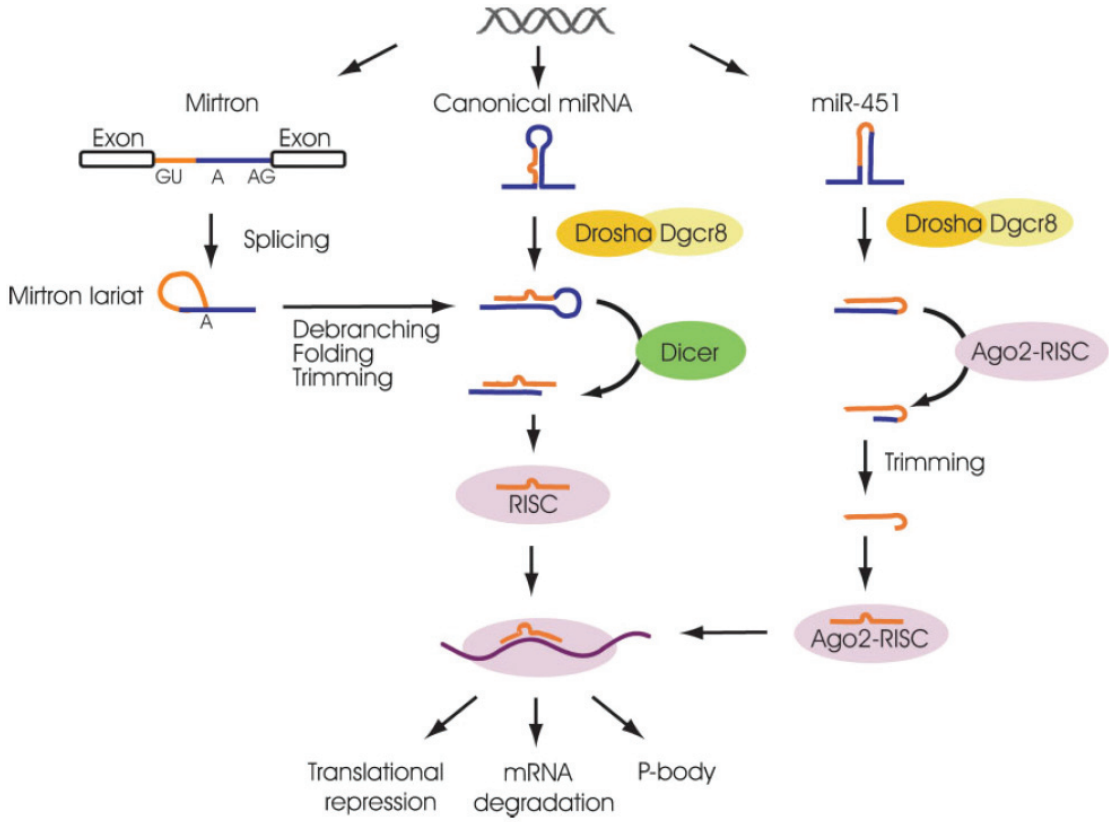


Figure 18: Processus de maturation des microARNs

La voie centrale correspond à la voie canonique du processus de maturation des microARN, la voie de gauche correspond à la voie des Mirtrons, tandis que celle de droite est spécifique au cluster miR-145. La maturation de ce cluster est dépendante de Drosha mais indépendante de Dicer. Ago2 va cliver le pre-miR-145 pour donner le miR-145 mature.
(Li and He, 2012)

1.6.3 Les microARNs

1.6.3.1 Introduction sur les microARNs

Les microARNs sont de petits ARNs, compris entre 18 et 25 paires de bases, impliqués dans de nombreux mécanismes de régulation de la pluripotence. Les premiers microARNs ont été découverts chez *Caenorhabditis elegans* (Ambros and Horvitz, 1984; Lee et al., 1993). Depuis de nombreux autres ont été découverts, notamment lors de séquençage à haut débit de différents tissus et organes (He and Hannon, 2004). Les microARNs sont localisés dans les introns ou les exons de gènes codant ou non-codant pour des protéines, ou alors dans des sites du génome indépendants (Kim et al., 2009). Avant de devenir des microARNs, ceux-ci sont transcrits par l'ARN polymérase II en pri-miRNAs. La voie canonique commence par le clivage des pri-miRNAs en pré-miRNAs, par une ribonucléase nucléaire de type III, appelé Drosha. Avec son partenaire Dgcr8, elle va se fixer de manière spécifique sur le pri-miRNA et le couper. Dgcr8 est capable de reconnaître spécifiquement 11 paires de bases (Han et al., 2006) (Figure 17). Après clivage, le pré-miRNA est exporté vers le cytoplasme par l'Exportine 5 (Lund et al., 2004), puis va être une nouvelle fois clivé par Dicer, une autre ribonucléase de type III, de manière spécifique (avec reconnaissance des 22 paires de bases), ce qui génèrera des duplex de miRNAs matures (double brins). Ensuite, TAR RNA Binding Protein (TRBP), une protéine reconnaissant les ARNs double brin, va recruter le complexe Dicer-miRNA avec les proteines Argonautes (Ago) afin de former un complexe appelé RISC (RNA-Induced Silencing Complex). C'est ce complexe qui va ensuite réguler les ARNs grâce à la complémentarité du miRNA (Chendrimada et al., 2005) (Figure 18). Deux autres voies de maturation, la voie des Mirtrons (microRNAs localisés dans les introns de gènes codants) (Babiarz et al., 2008) et la voie indépendante de Dicer (essentiellement utilisée par le cluster miR-145) (Cheloufi et al., 2010), conduisent toutes au complexe RISC (Figure 18).

1.6.3.2 Les microARNs impliqués dans le maintien de la pluripotence

Les microARNs ont été décrits comme vraiment importants dans les PSCs lorsque des équipes de recherche ont étudié des lignées de mESCs Dicer-/- ou Dgcr8-/-. Ces deux enzymes, qui sont des ribonucléases (similaire aux RNAses III), sont impliqués dans la maturation de pri-microARNs en microARNs (Kanellopoulou et al., 2005; Murchison et al., 2005; Wang et al.,

2007b). Deux phénomènes différents sont constatés dans ces cellules modifiées: une réduction de la prolifération due à un arrêt en phase G1 et une résistance à la différenciation. Les microARNs impliqués dans l'apparition de ces phénotypes ont été découverts ensuite ; il s'agit des clusters miR-209 et miR-302, appelés ESCCs (ES Cell-specific Cell-cycle regulating miRNAs). Lorsque ces clusters sont introduits dans des mESCs Dicer-/- ou Dgcr8-/-, un rétablissement du maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement a été observé (Wang et al., 2008b). De plus, le cluster miR-290 est le cluster le plus exprimé dans les mESCs à hauteur de 60 à 70% des microARNs totaux (Marson et al., 2008). La fonction de ce cluster est reliée au cycle cellulaire car il inhibe p21 et LATS2 qui sont normalement des répresseurs de la transition G1/S. Ce cluster est possiblement responsable de la faible durée de la phase G1 (Wang et al., 2008b). De plus, ce cluster est aussi impliqué dans la prévention de la différenciation des mESCs, car il est responsable de la méthylation de gènes spécifiques. En effet, miR-290 prévient l'expression de *Rbl2* qui est un répresseur des DNA methyltransferases, impliquées dans les méthylations *de novo* (Sinkkonen et al., 2008). Enfin, miR-290 est in inhibiteur de DKK1, (Dickkopf-related protein 1) qui est lui-même un inhibiteur de la voie Wnt, ce qui évite aussi la différenciation (Zovoilis et al., 2009).

1.6.3.3 Les microARNs impliqués dans la reprogrammation

Les miRNAs sont également impliqués dans la reprogrammation. En effet, lorsqu'on pratique un transfert nucléaire, il existe des facteurs cytoplasmiques dans l'ovocyte (des ARNs maternels) qui sont capables de reprogrammer le noyau injecté. De plus, lorsqu'on reprogramme des cellules par le biais des 4 facteurs décrits par S. Yamanaka, il y a une forte augmentation de l'expression des miRNAs ESCC (Li et al., 2011). Enfin, il est également possible de reprogrammer des fibroblastes en iPSCs seulement en surexprimant le cluster miR-302. Ce qui apparait très surprenant est l'efficacité de reprogrammation observée dans ce cas, qui est 100 fois supérieure à celle obtenue avec le cocktail classique de 4 gènes (Anokye-Danso et al., 2011). Tous les membres du cluster miR-302 ont des sites de fixation identiques et donc les mêmes cibles. Une d'entre elles est le gène *Lefty*. *Lefty* joue un rôle dans l'engagement de l'embryon dans la gastrulation par la répression de la voie TGFβ/Activine/ Nodal, car ce gène est un antagoniste de *Nodal* (Tabibzadeh and Hemmati-Brivanlou, 2006). La voie TGFβ/Activine/Nodal est également responsable du maintien des hESCs par l'intermédiaire de Smad2/3 (James et al., 2005; Vallier et al., 2005). Il a été montré que *Lefty* est régulé

négativement par le cluster miR-302 (Barroso-delJesus et al., 2011), ce qui permet aux cellules de se maintenir en autorenouvellement.

1.6.3.4 Les microARNs impliqués dans la différenciation

A l'inverse des clusters miR-290 et miR-302, le cluster Let-7 agit comme un inhibiteur de la pluripotence. Let-7 est très peu exprimé dans les mESCs et l'augmentation de son expression induit leur différenciation. Mir-290 a un fonction antagoniste de Let-7, car il induit l'expression du gène *Lin28*, qui code pour une protéine dont le rôle est de se fixer sur les pri-miRNAs de let-7 et d'empêcher leur maturation (Melton et al., 2010). De plus, ces deux clusters ont un rôle antagoniste au niveau du cycle cellulaire. En effet, lorsque miR-290 induit la transition G1/S en inhibant les kinases CDK, inhibiteurs de cette transition ???, Let-7 va empêcher cette transition en inhibant Cdk4 et la Cycline D (Schultz et al., 2008). Let-7 est aussi impliqué dans l'inhibition de gènes de pluripotence incluant *N-Myc, C-Myc, Sall4* et *Lin28* (Melton et al., 2010; Zhong et al., 2010). Les fonctions opposées de ces deux clusters permettent aux mESCs de pouvoir facilement et rapidement décider de leur engagement dans une voie de différenciation ou de maintenir l'autorenouvellement.

1.6.3.5 Les microARNs impliqués dans le statut naïf et amorcé

Nous venons de voir qu'il existe deux clusters impliqués dans le maintien des mESCs au stade pluripotent : miR-290 et miR-302. Il a été montré récemment que ces deux clusters étaient exprimés de manière antagoniste entre les stades naïf et amorcé (Jouneau et al., 2012). En effet, en comparant 4 lignées de mESCs et 7 de mEpiSCs, les chercheurs ont révélé que 302 microARNs étaient exprimés différemment et ce de manière significative entre les mESsC et les mEpiSCs. Sur ces 302 microRNAs, 226 sont plus exprimées dans les mESCs contre 76 chez les mEpiSCs. Quatre clusters apparaissent comme représentatifs des mEpiSCs : miR-302d, miR-34c, miR-367 et Let-7. Deux clusters sont spécifiques des mESCs : miR-294 et miR-142-3p (Jouneau et al., 2012). Comme précisé plus tôt, les ESCs des autres mammifères sont plus proches du statut EpiSC que du statut ESC. Ce postulat peut être confirmé par les microARNs. En effet, il a été montré que plus de 60% des microARNs des hESCs sont compris dans le cluster miR-302 (Lipchina et al., 2011).

Un constat similaire a été fait au niveau de l'embryon de lapin (Maraghechi et al., 2013). Cette équipe a analysé l'expression des microARNs dans des embryons de lapin lors du développement précoce et également sur des cellules ESC-like (c'est à dire des lignées d'ESC non stabilisées). Elle a observé que du stade ovocytes jusqu'au stade blastocyste (soit 4,5 dpc), il y a une augmentation de l'expression du cluster de miR-290. À partir de ce moment, l'expression reste à un niveau équivalent jusqu'au 6ème jour. En revanche le cluster miR-302 ne commence à s'exprimer qu'à 6 dpc. Enfin, dans les cellules ESC-like de lapin, ce groupe montre que c'est le cluster miR-302 qui régule le maintien de la pluripotence, bien qu'il soit spécifique du stade épiblaste tardif chez l'embryon.

1.6.4 Les marques épigénétiques

1.6.4.1 Introduction

Les cellules souches pluripotentes possèdent des caractéristiques épigénétiques qui les distinguent très fortement des autres types de cellules somatiques. Il existe des motifs de méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs et une organisation des histones qui leur sont propres. Ces particularités permettent de réguler l'expression des gènes clefs, en activant ceux responsables du maintien de l'autorenouvellement tels que *Oct4* et *Nanog*, et en réprimant ceux inducteurs de la différenciation tels que *Cdx2* (Trophectoderme) et *Gata6* (Endoderme). Cette régulation se fait principalement sous l'action de complexes protéiques *Ezh2, Eed* et *Suz12* du groupe Polycomb (PcG) qui sont activés par le noyau de pluripotence. Par ailleurs, sur certains gènes de différenciation, les ESCs présentent simultanément deux modifications d'histones appelées « marque bivalente » : les triples méthylations activatrice (H3K4me3) et inhibitrice (H3K27me3). Les gènes possédant une marque bivalente sont en général éteints mais la seule disparition de la marque H3K27me3 entraine leur activation. Ce système spécifique aux PSCs permet notamment aux gènes du développement de passer rapidement d'un état inactif à un état actif lors de la différenciation (Niwa, 2007).

1.6.4.2 L'inactivation du chromosome X (XCI)

Lors du développement embryonnaire des individus femelles, un évènement très important apparait. Il s'agit de l'inactivation d'un des deux chromosomes X (XCI). Il correspond à une forme de compensation entre les lignées femelles qui possèdent deux chromosomes X et les lignées mâles qui n'en contiennent qu'un. Ce phénomène est régulé différemment entre les cellules murines et humaines. Cette inactivation a été découverte dans les années 60 (Lyon, 1961) et est contrôlé par le gène *Xist* (X Inactive Specific Transcript).

1.6.4.2.1 XCI dans l'embryon

Chez la souris l'inactivation du X se fait deux fois. Au début du développement jusqu'au stade blastocyste (avant implantation), le chromosome X paternel (Xp) est inactivé. C'est la forme d'inactivation dite à empreinte parentale. On peut observer la présence de Xist, un ARN non codant, sur le chromosome X et des méthylations inhibitrices de type H3K37me3 (Mak et al., 2004; Okamoto et al., 2005). Le chromosome X maternel est protégé de cette inactivation par l'expression d'un répresseur antagoniste à *Xist*, nommé *Tsix*, séquence anti-sens de *Xist* d'où son nom (Lee, 2000; Lee et al., 1999; Sado et al., 2001). Les cellules qui vont se spécialiser dans les tissus extra-embryonnaires (cellules du trophectoderme et de l'endoderme primitif) garderont toujours l'empreinte paternelle (Mak et al., 2002). En revanche, en ce qui concerne les cellules de l'épiblaste, il se produit une réactivation du chromosome Xp (XCR). Actuellement, le mécanisme qui contrôle cette réactivation est inconnu. Après l'implantation de l'embryon, les cellules de l'épiblaste vont commencer à se différencier, et une XCI aléatoire va se mettre en place, toujours contrôlée par *Xist* et *Tsix*. L'expression de *Tsix* augmente, le chromosome qui réussira à maintenir *Tsix* restera actif (Xa) alors que l'autre deviendra inactif (Xi). Les mécanismes de cette XCI aléatoire ont pu être décryptés par l'utilisation des mESCs.

1.6.4.2.2 XCI dans les ESCs murines

Les ESCs proviennent de l'ICM, il est donc logique de retrouver le phénotype XaXa dans les lignées femelles. Pour étudier la XCI aléatoire, des équipes ont étudié les cellules au cours d'un protocole de différenciation en cellules EpiSC. Elles ont observé une augmentation

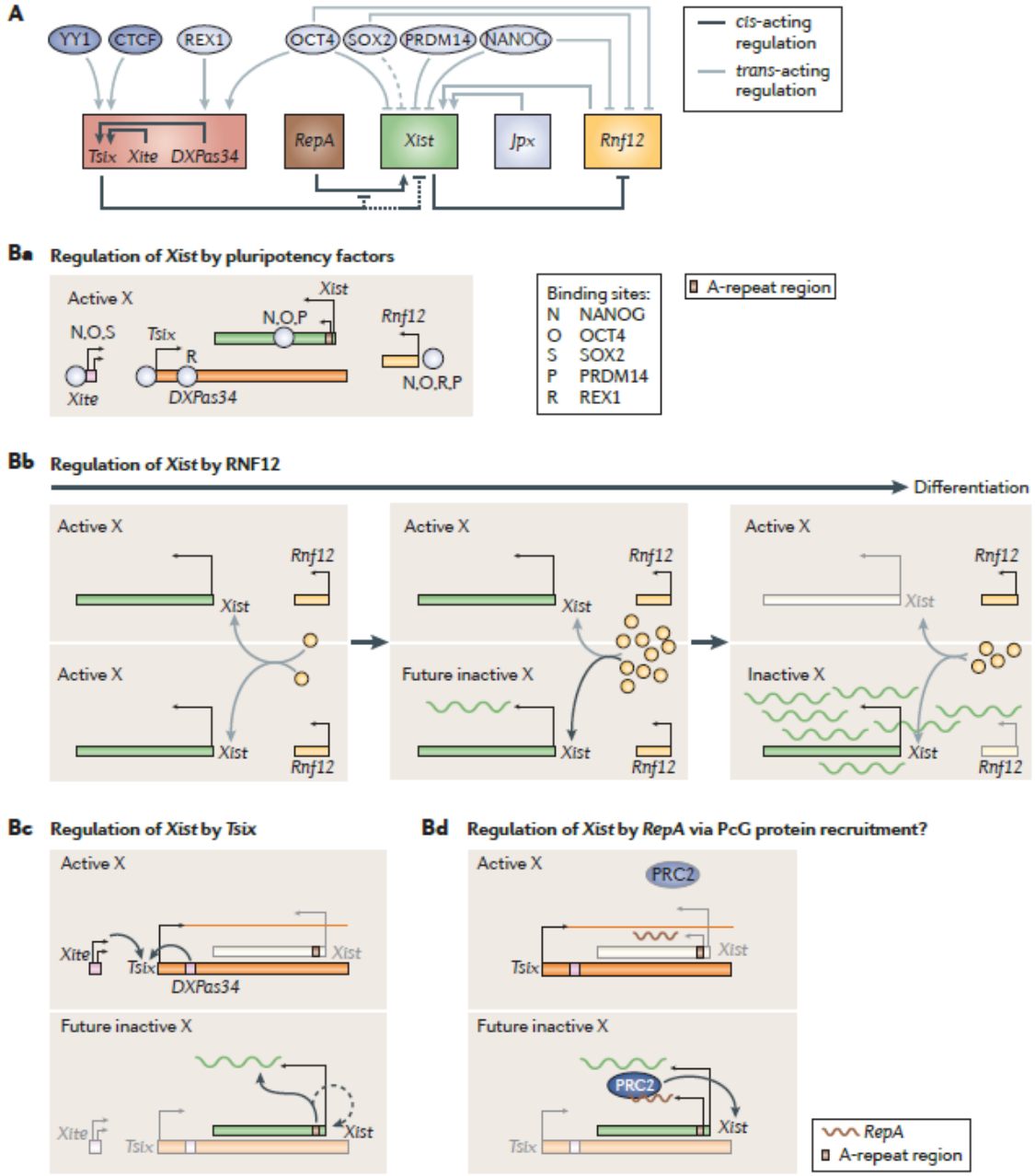


Figure 19: Régulation de la XCI dans les mESCs

(A) Réseau des interactions génétiques sur le chromosome X

(B) Différents types de régulation de *Xist*

(Ba) Sites de fixation des facteurs de pluripotence

(Bb) Activation de Rnf12 durant la différenciation, qui entraine l'activation de Xist selon un dosage précis. Xi en réponse et par l'intermédiaire de *Xist*, inactive *Rnf12*.

(Bc) Régulation de Xist par Tsix. *RepA* est nécessaire à l'activation de *Xist*.Tsix est activé par *Xite* (X-inactivation intergenic transcription elements) et *DXPas34*.

(Bd) Régulation possible de *Xist* par *RepA* et PRC2. *Tsix* a une action antagoniste à PRC2 sur Xa.

(Augui et al., 2011)

de l'ARN Xist fixé sur le Xi. Le rôle de Xist est de se fixer et de recruter l'élément *cis* Poylcomb Repressive Complex 2 (PRC2) (Khalil et al., 2009; Zhao et al., 2008), qui va ensuite permettre à la marque H3K37me3 de se déposer sur le future Xi. Cette marque va à son tour recruter PRC1 qui va ubiquitiner les histones H2A, ce qui entraînera la compaction de la chromatine (Fang et al., 2004; de Napoles et al., 2004). Le Xi a aussi d'autres niveaux d'inactivation comme la diminution de marque d'activation de la chromatine telle que l'acétylation de l'histone H4 (Keohane et al., 1996). Xi va également être enrichi en nucléosome. L'histone H2A deviendra alors un histone macroH2A (Costanzi and Pehrson, 1998). Finalement, les promoteurs de gènes localisés sur le Xi vont être complètement méthylés, ce qui finalisera le verrouillage du chromosome X. Dans les mESCs, il a été montré (Edith Eard – données non publiées) que les cellules femelles XX étaient moins sensibles à la différenciation que les cellules XY mâle. Cette équipe a également observé que les cellules X0 (un seul X chez les femelles) avaient la même sensibilité que les cellules XY envers la différenciation. A l'aide d'une analyse en RT-qPCR sur cellules uniques, il a été démontré que lorsque les gènes de pluripotence sont surexprimés, *Xist* est réprimé. En effet, il a été montré dans des mESCs mâle n'exprimant pas *Nanog* et *Oct4*, il y a une surexpression de *Xist* (Navarro et al., 2008). De la même manière dans des lignées femelles n'exprimant pas *Oct4*, on observe une accumulation de *Xist* sur les deux X (Donohoe et al., 2009). D'autres facteurs tels que *Sox2, Tcf3* et *Prdm14* (PRDI-BF1 and RIZ homology Domain Containing 14) sont également impliqué dans la régulation de *Xist* (Figure 19A). Seulement il été montré que ces facteurs ne se fixaient pas aux promoteurs de *Xist*. Ce qui signifie que ces gènes régulent *Xist* indirectement (Marson et al., 2008; Navarro et al., 2008) (Figure 19Ba). Les autres facteurs responsables de l'activation de *Xist* sont *Rnf12* (RING finger protein 12) et *Xic–Xic* (X inactivation center). Leur surexpression induit l'expression de *Xist* (Donohoe et al., 2009; Jonkers et al., 2009). *Rnf12* agirait selon une dose précise (Figure 19Bb). Enfin, une région de *Xist*, composée d'une répétition d'adénine (appelé *RepA*), est un des candidats à l'activation de *Xist*. En effet, il a été proposé que *RepA* puisse se fixer sur PRC2 et activer la transcription de *Xist* en retour (Zhao et al., 2008) (Figure 19Bc et Bd).

1.6.4.2.3 XCI chez les autres mammifères

Le phénomène de XCI est différent chez l'Homme. Lorsqu'on étudie le placenta (tissu extra-embryonnaire) il y a des évidences qui montrent que l'allèle favorisé est le Xm, ce qui suggère une empreinte paternelle (Harrison and Warburton, 1986). Le même résultat est observé lorsqu'on différencie des hESCs en trophoblaste (Dhara and Benvenisty, 2004). En revanche, d'autres études montrent que l'inactivation du X est aléatoire, car on retrouve dans le placenta une organisation globale en « patch » de cellules avec ou sans XCI, à la manière des chats tricolores à écailles de tortue (« calico cat ») (Moreira de Mello et al., 2010). De plus, il n'y a pas d'inactivation du Xp avant le stade blastocyste chez l'embryon humain, la XCI apparait donc qu'à partir de l'implantation (E7). Chez le cheval, la XCI est aussi aléatoire (Wang et al., 2012). En revanche chez les bovins, la XCI est soumise complètement à empreinte parentale (Xp) dans le placenta. Dans le cas du singe, Xist et d'autres facteurs associés se fixent aléatoirement sur le chromosome X dans les cellules du trophectoderme comme dans les cellules de l'ICM, et donc la XCI apparait dans les cellules des tissus extra-embryonnaires comme dans celles de l'épiblaste (Tachibana et al., 2012). Chez le lapin, il n'y a pas de XCI avant le stade blastocyste (Okamoto et al., 2011).

Actuellement, on ne comprend pas vraiment la raison pour laquelle les embryons de souris ont une XCI soumise à empreinte entre les stades 2 cellules et blastocystes. L'hypothèse est que les souris ont une EGA précoce, qui débute au stade 2 cellules. La XCI permettrait de compenser l'activation des deux chromosomes. Ensuite la réactivation du Xp se ferait grâce à l'expression des gènes de pluripotence, qui inhibe l'expression de *Xist*. Au stade épiblaste, il y a diminution de l'expression des gènes de pluripotence ce qui permet à la XCI aléatoire de se mettre en place. Les autres mammifères ayant une EGA qui débute au stade 8-16 cellules n'ont pas besoin de cette action compensatrice. De plus, il s'avère que les chromosomes X, chez l'Homme, ne sont pas complètement éteints. Certains gènes ont besoin d'être exprimés par les deux chromosomes. La preuve en est que les femmes X0 sont atteintes du syndrome de Turner dont les symptômes sont la petite taille, des problèmes cardiaques, rénaux et auditifs.

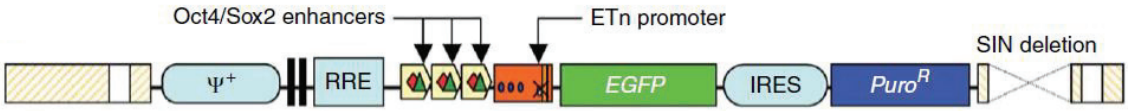


Figure 20: Structure du vecteur EOS

Etn : Early Transposon ; IRES : Internal Ribosome Entry Site ; $Puro^R$: Gène de résistance à la puromycine
(Hotta et al., 2009)

1.6.4.3 L'enhancer distal d'Oct4

Le gène *Oct4* est montré comme exemple de la régulation épigénétique des gènes de pluripotence qui est différente entre les cellules naïves et amorcées. *Oct4* est exprimé tout le temps dans la lignée germinale, du zygote aux cellules primordiales germinales (PGCs), mais sa régulation varie selon les cellules et les stades. En effet, l'équipe de H. Schöler a montré que *Oct4* était régulé par son enhancer distal (DE) dans les cellules de l'ICM et dans les PGCs ; alors que dans les cellules de l'épiblaste, c'est l'enhancer proximal (PE) qui régule ce gène (Yeom et al., 1996). Cette régulation est respectivement conservée pour les mESCs et mEpiSCs (Osteil et al., 2013; Tesar et al., 2007; Yeom et al., 1996). Un enhancer, quel qu'il soit, est régulé par des éléments en *trans*. Dans le cas d'*Oct4*, le complexe OCT4/SOX2 se fixe sur l'enhancer pour activer *Oct4* au niveau des régions conservées 3 et 4 (CR3 et CR4). Comme leur nom l'indique, ces régions sont très conservées au cours de l'évolution et on le retrouve dans le promoteur du gène de lapin (Kobolak et al., 2009). Il est ainsi possible d'utiliser l'activité du DE dans les ESCs pour discriminer les états naïf et amorcé. Dans ce but, on peut utiliser une construction virale qui permet d'exprimer le gène de la GFP et le gène de la résistance à la puromycine grâce à une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site), à partir du promoteur minimal d'un transposon (Early Transposon) couplé au motif de fixation CR4 répété 3 fois en tandem (Hotta et al., 2009) (Figure 20). Cette construction (appelée vecteur EOS - Early Transposon promoter and *Oct4* and *Sox2* enhancers), une fois insérée dans le génome des lignées d'intérêt, permet de marquer par la fluorescence verte et de sélectionner par la puromycine les cellules ayant une expression d'*Oct4* contrôlée par le DE. On pourrait s'attendre à ce que la sélection permette d'enrichir la population cellulaire en cellules naïves. Or, les travaux qui ont conduit à la fabrication de ce vecteur EOS, l'utilisent pour sélectionner des cellules humaines reprogrammées ou hiPSCs. Ce vecteur permet donc une sélection de cellules pluripotentes mais pas nécessairement naïves (Hotta et al., 2009).

1.7 Projet de doctorat

La souris est souvent utilisée comme modèle car les recherches sur les PSCs dans cette espèce sont très avancées et ces cellules sont utilisables comme outil biotechnologique pour la création de lignées transgéniques. Cependant nous avons vu que l'espèce murine est plutôt une exception qu'une généralité pour l'ordre des mammifères, et de ce fait n'est pas un modèle incontestable. Le développement embryonnaire de la souris avec la formation d'un ovocylindre est très particulier, de même que l'existence possible d'une diapause dans cette espèce. La diapause est elle-même contrôlée par le LIF, un acteur indispensable au maintien des PSCs de souris, mais pas du tout nécessaire à celui des PSCs humaines. Toutes ces raisons font qu'il est indispensable d'avoir un modèle autre que la souris. C'est pourquoi le lapin est un très bon candidat car il est phylogénétiquement plus proche de l'Homme que ne l'est la souris. De nombreuses maladies humaines, comme l'athérosclérose ou des maladies cardiovasculaires, dont le métabolisme est quasi similaire à celui de l'Homme, sont déjà étudiées chez le lapin. Enfin le lapin s'avère être un très bon modèle alternatif pour l'étude des PSCs des autres mammifères, car les embryons de lapins se développent en formant un disque embryonnaire comme les embryons humains ou ceux d'autres espèces. Le lapin présente aussi de nombreux avantages en ce qui concerne les recherches sur les ESCS, car il est possible d'avoir un grand nombre d'embryons pour un coût d'élevage moindre, ce qui est un atout non négligeable par rapport au singe qui pourrait être un modèle alternatif intéressant. L'absence de législation stricte sur l'utilisation du lapin en recherche expérimentale est aussi un avantage à son utilisation en comparaison des primates non humains. En revanche, l'utilisation du lapin comme modèle a quelques inconvénients. Les travaux concernant les PSCs de lapin ne sont pas aussi avancés que les travaux réalisés chez la souris, le singe ou encore l'Homme. Le génome du lapin n'est pas complètement annoté (ou du moins pas correctement). De plus, il existe peu d'outils moléculaires ou cellulaires spécifiquement développés pour une application chez le lapin, tels que des anticorps spécifiques par exemple. Néanmoins le lapin présente un intérêt non négligeable en recherche fondamentale comme appliquée.

Nous avons vu précédemment que les ESCs et les EpiSCs de souris sont les modèles respectivement des PSCs naïves et amorcées, et que les PSCs des autres mammifères sont stabilisées à un état proche de celui des cellules amorcées tout en ayant des caractéristiques naïves. Dans ce contexte, mon projet de thèse a eu pour but d'étudier la pluripotence des ESCs de lapin. Ce manuscrit présentera donc la dérivation et la caractérisation des ESCs de lapin obtenues en présence de FGF2 et leur comparaison aux iPSCs de lapin issues de la

reprogrammation de cellules somatiques adultes de lapin en présence aussi de FGF2. Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié cette année dans *Biology Open* (Osteil et al., 2013). Mon travail a ensuite consisté à dériver des ESCs de lapin en présence de LIF, c'est-à-dire dans des conditions de culture similaires à celles des cellules naïves. Cette partie de mon travail a permis d'étudier l'effet de la voie LIF/STAT3 dans les ESCs de lapin. L'ensemble de mon travail a abouti à une meilleure connaissance des mécanismes contrôlant l'autorenouvellement et la pluripotence des PSCs de mammifères autres que les rongeurs.

Je terminerai ce manuscrit par une analyse critique de mes résultats en comparaison des résultats publiés chez l'Homme ou d'autres espèces, ainsi que par les différentes perspectives qu'ouvrent mon travail pour améliorer la pluripotence des ESCs de lapin et aboutir à des cellules naïves capables de coloniser un embryon receveur. L'obtention de telles cellules est une étape clef dans le développement de l'utilisation du lapin comme modèle de maladies humaines ou comme modèle de thérapie cellulaire. De tels modèles sont indispensables pour assurer le futur essor de l'emploi des PSCs humaines en diagnostic et en thérapie, et ce en assurant une sécurité génétique et sanitaire de ces cellules.

RESULTATS

« Que l'on me donne une erreur féconde, pleine de graines,
prête à s'enrichir d'abondantes corrections.
Vous pouvez garder pour vous votre stérile vérité. »
Vilfredo Pareto (1848-1923)

2 RESULTATS

Les premières lignées d'ESCs obtenues chez le lapin (Honda et al., 2008; Wang et al., 2007a) présentaient des caractéristiques proches des cellules de primate et étaient incapables de coloniser un blastocyste receveur. Mais le statut de pluripotence des ESCs n'avait pas été précisément étudié chez cette espèce. Mon travail de thèse a eu donc pour but d'étudier la pluripotence des ESCs de lapin, en dérivant et en caractérisant différentes lignées d'ESC en présence de divers facteurs de croissance ou molécules activatrices de la pluripotence. Ce chapitre sera consacré à la présentation de mes résultats qui seront regroupés en 6 sous-chapitres, dont le fil conducteur est l'obtention de cellules naïves capables de produire des lapins chimères. La première partie est consacrée à la comparaison des lignées de rbESCs et de rbiPSC obtenues en présence de FGF2 dans notre laboratoire, comparaison qui a fait l'objet d'un article publié cette année dans *Biology Open* (Osteil et al., 2013). Les parties suivantes relatent les expériences de dérivation de rbESC dans d'autres conditions de culture et l'analyse du rôle du LIF dans le maintien de la pluripotence de ces cellules.

2.1 Les rbPSC-FGF

La dérivation et la caractérisation des lignées de rbPSCs dépendantes du FGF2 sont détaillées dans l'article inclus dans ce manuscrit à la page 85. Je ne reprendrai donc dans ce paragraphe que les informations et les conclusions essentielles à la compréhension de la suite de mon travail.

2.1.1 La dérivation

La première étape de mon projet a été d'obtenir des lignées de rbESCs, en me basant sur les milieux de culture employés par le groupe de A. Ogura pour obtenir les premières lignées d'ESC chez le lapin présentant des caractéristiques similaires à celles des cellules de primates (Honda et al., 2008). J'ai utilisé une méthode de dérivation très proche de celles employées chez tous les mammifères. Les embryons au stade 8-cellules (36h après fécondation) ou morula (60h après fécondation) ont été prélevés depuis les cornes utérines de femelles New Zealand préalablement sacrifiées, et cultivés *in vitro* jusqu'au stade blastocyste. Les embryons utilisés étaient issus de la fécondation de femelles sauvages avec le sperme d'un mâle transgénique hétérozygote exprimant la GFP (Al-Gubory and Houdebine, 2006). Cette lignée de lapin transgénique a été obtenue par l'équipe de L-M. Houdebine au centre INRA de Jouy-en-Josas, en microinjectant un vecteur plasmidique exprimant le gène de la GFP à partir du promoteur ubiquitaire E1α, dans le pronucléus mâle de zygote New Zealand. Les embryons utilisés pouvaient donc être sauvages ou hétérozygotes pour le gène de la GFP. Au stade blastocyste, les embryons ont été traités à la pronase pour éliminer le MM et la ZP, puis disséqués manuellement afin d'en isoler leur ICM. Ces derniers ont été cultivés sur des cellules nourricières (MEF traités à la mitomycine). Après 3 à 5 jours, les excroissances cellulaires ont été repiquées mécaniquement après un traitement à la collagénase de Type II de 5 minutes à 37°C. Les passages cellulaires suivants ont été réalisés avec la même procédure. Lorsque la lignée atteint le dixième passage, elle est considérée comme stabilisée. Ces lignées sont cultivées dans du milieu DMEM/F12 supplémenté avec 20% de Knock-Out Serum Replacement (KO-SR), 1% de Non Essential Amino Acid (NEAA), 1% de pyruvate (1mM), 1% de Penicilline-Streptomycine-Glutamine (PSG : P : 100U/mL ; S : 100µg/mL ; G : 2mM), 0.1% de β-Mercaptoethanol (0.1mM) et 1ng/mL de FGF2. Avant les travaux de l'équipe

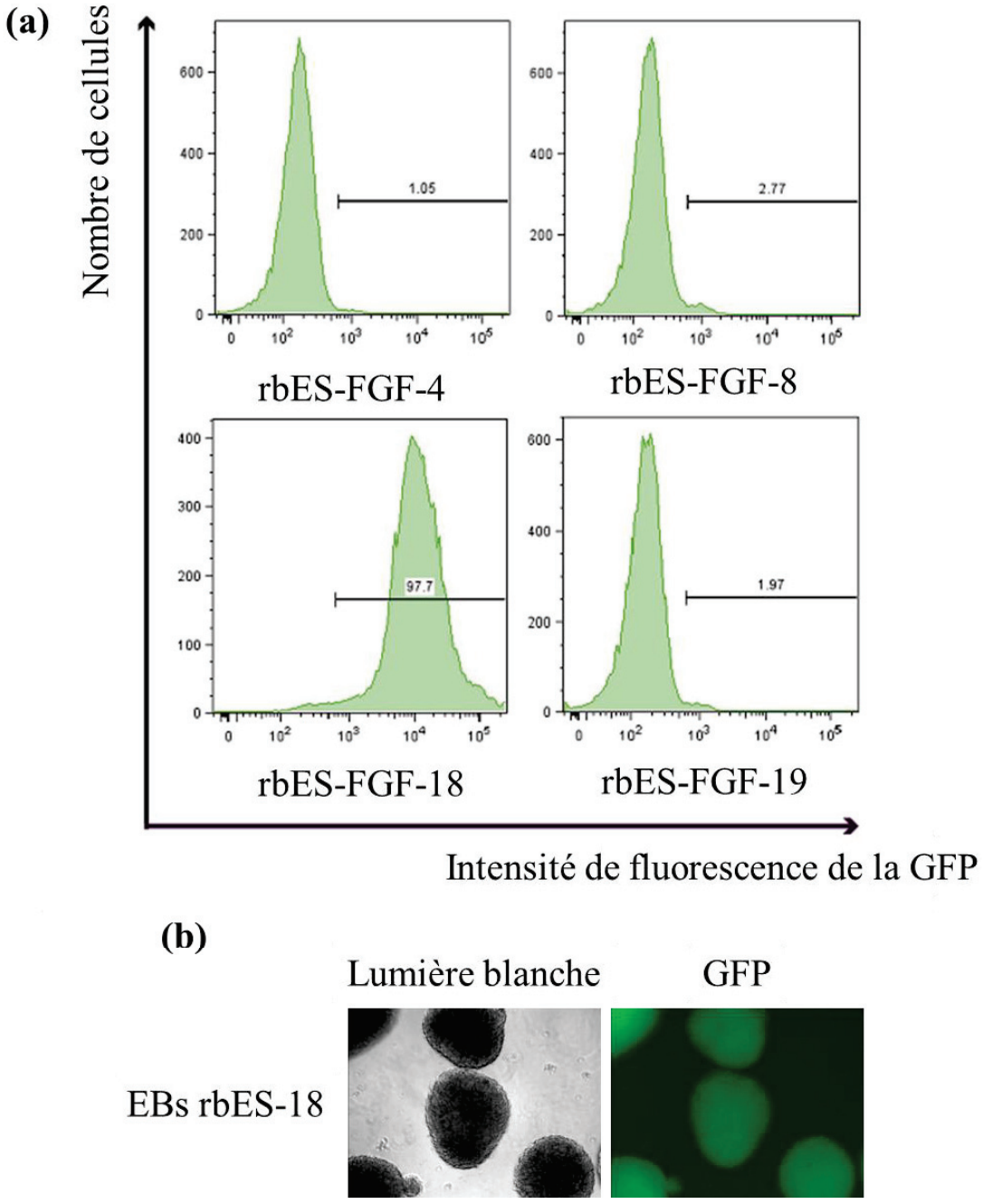


Figure 21: Révélation de l'expression de la protéine GFP

(a) Analyse par cytométrie en flux de la fluorescence de la GFP dans les 4 lignées de rbESC-FGF. Seule la lignée rbES-18 est issue d'un embryon exprimant la GFP.
(b) Révélation de la fluorescence des corps embryoïdes formés par la lignée rbES-18

d'A. Ogura (Honda et al., 2008), nous n'avions pas pu maintenir de lignées au-delà de 9 passages cellulaires. La différence majeure a été l'utilisation de milieu DMEM/F12 par rapport au DMEM ou KO-DMEM. Grâce à ce protocole, nous avons pu stabiliser 4 lignées de rbESCs, nommées rbES-4, -8, -18 et -19. Après analyse de ces lignées par cytométrie en flux nous avons pu constater que seule la lignée rbES-18 exprimait la protéine GFP (Figure 21).

Parallèlement à mon travail, des iPSCs de lapin ont été obtenues dans notre laboratoire par la reprogrammation de fibroblastes de peau d'oreille issus d'une femelle New Zealand, à l'aide de 4 vecteurs rétroviraux exprimant les gènes humains *Oct4, Sox2, Klf4* et *c-Myc*. Trois lignées complètement reprogrammées, c'est-à-dire ayant complètement réprimé l'expression des transgènes et présentant une forte expression des gènes endogènes caractéristiques de la pluripotence, ont été obtenues en présence de FGF2 et nommées rbiPS-B19, -B24 et -B29. Ces lignées de rbiPSCs sont cultivées dans le même milieu que les lignées de rbESCs, mais leur protocole de passage cellulaire est différent. Les rbiPSCs sont dissociées à l'aide de Tryspine (42µM) / EDTA (0.96mM), pendant 5 minutes, à 37°C. Elles sont donc cultivées en suspension unicellulaire, alors que les rbESCs sont passées en amas.

2.1.2 La comparaison des rbESCs et des rbiPSCs dépendantes du FGF2

La seconde étape de mon travail de thèse a consisté à caractériser les lignées de rbESCs. De la même façon, un autre étudiant en thèse dans notre laboratoire, Yann Tapponnier, a caractérisé les lignées de rbiPSCs. Les tests classiques de mise en évidence des propriétés de pluripotence ont ainsi été effectués sur les 7 lignées [Figures n°1 p88, 2 p89, S1 p102, S2 p103 et S3 p104 (Osteil et al., 2013)]. Ces lignées possèdent toutes les caractéristiques propres aux PSCs. Elles sont de très petite taille et forment des colonies plates de cellules très serrées. Elles expriment la phosphatase alcaline et le gène *Oct4*. Elles sont pluripotentes car elles sont capables de former des EBs *in vitro* et des tératomes *in vivo* composés de cellules différenciées dans les trois feuillets embryonnaires. L'analyse de leur caryotype montre qu'elles sont stables en culture. Nous avons donc stabilisé en culture des lignées de rbPSCs pluripotentes.

Cependant, bien qu'elles possèdent des caractéristiques similaires, les rbESCs et les rbiPSCs présentent également plusieurs différences importantes. La première correspondant à l'expression de marqueurs de surface spécifiques des PSCs (Figures n°3 p90, S3 p104 et S4 p105 (Osteil et al., 2013)). Lorsqu'on compare les résultats obtenus par immunohistochimie, on peut voir que les rbiPSCs expriment SSEA1 et SSEA4, tandis que les rbESCs expriment seulement SSEA1. Ce résultat est étonnant car il s'avère que les mESCs expriment uniquement

SSEA1 et les cellules de primate (hESCs et rhESCs) expriment juste SSEA4. L'analyse de ces marqueurs en cytométrie en flux a permis de mettre en évidence une hétérogénéité des lignées avec deux sous-populations de rbESCs (SSEA1+ et SSEA1-) et 4 sous-populations de rbiPSCs (SSEA1+/4+, SSEA1+/4-, SSEA1-/4+ et SSEA1-/4-). Une proportion importante des rbiPSCs co-exprime les deux marqueurs (26,6% pour la lignée rbiPSC-B19). Afin de savoir si chaque sous-population est stable, nous les avons triées sur la base de l'expression des deux marqueurs SSEA1 et SSEA4, puis nous les avons replacées en culture. Cette expérience a montré que chaque sous-population triée est capable de réexprimer les deux marqueurs pour retrouver son profil d'expression d'origine. Il semble donc que l'expression de ces marqueurs peut fluctuer sans que les cellules perdent leurs caractéristiques.

Nous avons également analysé le cycle cellulaire de ces sous-populations, car une des caractéristiques des PSCs est leur cycle particulier avec une phase G1 très courte, un nombre important de cellule en phase S et l'absence de point de contrôle en phase G1 après endommagement de l'ADN. Dans ce but, nous avons effectué un marquage à l'iodure de propidium (PI), un intercalant de l'ADN permettant de mesurer la quantité d'ADN présente dans chaque cellule à un instant donné. Cette méthode permet de définir le nombre de cellules dans chaque phase du cycle à un instant donné, et donc de fournir une estimation de la durée du cycle cellulaire. Nous avons observé que le nombre de cellules en phase S était plus important pour les rbiPSCs (38% en moyenne) que pour les rbESCs (20% en moyenne), bien qu'il soit inférieur à celui des mESCs (68%) [Figure n° 4 p92 et Tableau S5 p110 (Osteil et al., 2013)]. De même les rbiPSCs possèdent moins de cellules en phase G1 (43% en moyenne) que les rbESCs (74% en moyenne), contre 20% pour les mESCs. De plus, les rbESCs SSEA1+ possèdent environ 55% de cellules en G1 contre 75% pour les rbESCs SSEA1-. De même, les rbiPSCs ont en moyenne 38%, 33%, 38% et 48% de cellules en G1 respectivement pour les cellules SSEA1+/4-, SSEA1+/4+, SSEA1-/4+, et SSEA1-/4-. Les PSCs de lapin SSEA1+ et/ou SSEA4+ présentent donc une phase G1 plus courte que les PSCs SSEA1- et SSEA4-. Afin de mesurer la réponse aux dommages à l'ADN de ces mêmes sous-populations, nous avons traité les cellules avec de la Doxorubicine (Adryamicin®), un intercalant de l'ADN qui crée des cassures dans les hélices double brins de l'ADN, avant de réaliser le marquage au PI [Figure n° 4 p92 et Tableau S5 p110 (Osteil et al., 2013)]. Nous avons ainsi observé que les rbiPSCs SSEA1+ ne possèdent qu'un seul point de contrôle en phase G2, alors que les rbESCs SSEA1+ en possèdent 2, en phases G1 et G2, bien que la proportion de rbESCs SSEA1+ bloquées en phase G1 soit plus faible que celle des rbESCs SSEA1-. Les rbiPSCs SSEA1-/4+ et les double-négatives possèdent également 2 points de contrôle. Ces résultats montrent donc que seules les

rbiPSCs SSEA1+ possèdent un cycle cellulaire typique de PSCs avec une phase G1 courte, une forte proportion de cellule en phase S et l'absence de point de contrôle en G1 en réponse aux dommages de l'ADN.

L'expression de 22 gènes associés au maintien de la pluripotence naïve ou amorcée chez la souris, a été analysée par RT-qPCR sur les différentes sous-populations de rbESCs et rbiSPCs. Les résultats ont été normalisés à l'aide de l'expression de deux gènes de ménage, *Gapdh* et *Tbp* (TATA-Box Protein) et comparés aux niveaux d'expression observés dans les cellules de l'ICM de lapin ($\Delta\Delta$Ct) [Figures n° 6C, 6D p95, 7 p96, S6 p107 et Tableau S4 p111 (Osteil et al., 2013)]. Là encore des différences importantes ont été observées entre les rbiPSCs et les rbESCs, et entre les sous-populations positives et négatives pour SSEA1. Les rbiPSCs SSEA1+ sont les cellules ayant l'expression des gènes de pluripotence le plus proche de celui de l'ICM, contrairement aux rbiPSCs SSEA1-. Les rbESCs présentent une expression intermédiaire entre les rbiPSCs SSEA1+ et SSEA1-. En revanche, il ne semble pas y avoir de différences majeures dans l'expression des gènes de pluripotence entre les cellules SSEA1+ ou SSEA1- parmi les rbESCs.

Nous avons aussi testé la fonctionnalité de l'enhancer distal de *mOct4* dans les PSCs de lapin, grâce à l'utilisation du vecteur lentiviral EOS qui permet l'expression du gène de la GFP et du gène de la résistance à la puromycine à partir du promoteur minimal ETn associé à cet enhancer [Figures n° 5 p93 et S4 p105(Osteil et al., 2013)]. Dans ce but, toutes les lignées de rbPSCs (sauf la lignée rbES-18 qui exprime déjà la GFP) ont été infectées avec le lentivirus EOS, puis analysées par cytométrie en flux. Afin de mieux apprécier les différences entre lignées, nous avons créé un indice d'expression I_E égal au nombre de cellule exprimant fortement la GFP ($\%GFP^+ \geq 10^3$) sur le nombre total de cellule exprimant la GFP ($\%GFP^+_T$) multiplié par le taux d'infection I_R. Selon cet indice nous pouvons voir que les lignées contrôles positif (mESC) et négatif (EpiSC) ont respectivement les indices le plus fort et le plus faible. Les lignées de rbiPSCs ont, quant à elles, un indice beaucoup plus fort que les lignées de rbESCs. Ce résultat a été confirmé par l'impossibilité de sélectionner à la puromycine les lignées de rbESC infectées par le lentivecteur EOS, contrairement aux lignées de rbiPSCs.

Enfin, l'ensemble de cette caractérisation a été complétée par un test fonctionnel en microinjectant les rbPSCs dans des embryons au stade 8-cellules, afin de déterminer leur capacité à produire des embryons chimères au stade blastocyste. Les rbiPSCs sont capables de coloniser l'ICM d'embryons précoces à un taux très faible (environ 1.5%) tandis que les rbESCs en sont incapables, même en utilisant uniquement la fraction SSEA1+ des cellules [Figures n° 8 p97 et Tableau S5 p110 (Osteil et al., 2013)].

L’ensemble des analyses du cycle cellulaire, de l’expression des gènes de pluripotence, de la régulation du promoteur de *mOct4* et des tests de production de chimère, montre que les rbiPSCs sont plus proches de l’état naïf que les rbESCs et le marqueur SSEA1 discrimine les cellules ayant les meilleurs caractéristiques de pluripotence.

Article n°1: Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naïve pluripotency.

Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naïve pluripotency

Pierre Osteil[1,2,3,4,*], Yann Tapponnier[1,2,3,*], Suzy Markossian[1,2,3,4,*], Murielle Godet[1,2,3,4], Barbara Schmaltz-Panneau[5], Luc Jouneau[5], Cédric Cabau[6], Thierry Joly[3,7,8], Thierry Blachère[1,2,3], Elen Gócza[9], Agnieszka Bernat[1,2,3,‡], Martine Yerle[10], Hervé Acloque[10], Sullivan Hidot[1,2,3], Zsuzsanna Bosze[9], Véronique Duranthon[5], Pierre Savatier[1,2,3,4,§] and Marielle Afanassieff[1,2,3,4,§]

[1]INSERM, U846, Stem Cell and Brain Institute, 18 Avenue du Doyen Jean Lépine, F-69500 Bron, France
[2]Stem Cell and Brain Institute, F-69500 Bron, France
[3]Université de Lyon, F-69100 Villeurbanne, France
[4]INRA, USC1361, F-69500 Bron, France
[5]INRA, Biology of Development and Reproduction, F-78352 Jouy-en-Josas, France
[6]INRA, SIGENAE, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France
[7]ISARA-Lyon, F-69007 Lyon, France
[8]VetAgroSup, UPSP ICE, F-69280 Marcy l'Etoile, France
[9]Institute of Animal Biotechnology, Agricultural Biotechnology Center, H-2100 Godollo, Hungary
[10]INRA, UMR444, F-31326 Castanet Tolosan, France

*These authors contributed equally to this work
‡Present address: Laboratory of Molecular Diagnostics, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, Medical University of Gdansk, Poland
§Authors for correspondence (marielle.afanassieff@inserm.fr; pierre.savatier@inserm.fr)

Biology Open 2, 613–628
doi: 10.1242/bio.20134242
Received 25th January 2013
Accepted 2nd April 2013

Summary

Not much is known about the molecular and functional features of pluripotent stem cells (PSCs) in rabbits. To address this, we derived and characterized 2 types of rabbit PSCs from the same breed of New Zealand White rabbits: 4 lines of embryonic stem cells (rbESCs), and 3 lines of induced PSCs (rbiPSCs) that were obtained by reprogramming adult skin fibroblasts. All cell lines required fibroblast growth factor 2 for their growth and proliferation. All rbESC lines showed molecular and functional properties typically associated with primed pluripotency. The cell cycle of rbESCs had a prolonged G1 phase and a DNA damage checkpoint before entry into the S phase, which are the 2 features typically associated with the somatic cell cycle. In contrast, the rbiPSC lines exhibited some characteristics of naïve pluripotency, including resistance to single-cell dissociation by trypsin, robust activity of the distal enhancer of the mouse *Oct4* gene, and expression of naïve pluripotency-specific genes, as defined in rodents. According to gene expression profiles, rbiPSCs were closer to the rabbit inner cell mass (ICM) than rbESCs. Furthermore, rbiPSCs were capable of colonizing the ICM after aggregation with morulas. Therefore, we propose that rbiPSCs self-renew in an intermediate state between naïve and primed pluripotency, which represents a key step toward the generation of *bona fide* naïve PSC lines in rabbits.

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Share Alike License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0).

Key words: Rabbit model, Embryonic stem cell, Induced pluripotent stem cell, Pluripotency, Cell cycle

Introduction

Pluripotent stem cells (PSCs) can exist in two morphologically, molecularly and functionally distinct pluripotent states, designated as the naïve and primed states (Nichols and Smith, 2009). The first rabbit pluripotent stem cell (PSC) lines were produced from New Zealand White rabbit blastocysts in the form of embryonic stem cells [rabbit ESCs (rbESCs)] (Fang et al., 2006; Wang et al., 2007). In their undifferentiated state, rbESCs required both fibroblast growth factor 2 (FGF2) and growth factors of the transforming growth factor (TGF) β family (activin, nodal) for self-renewal (Wang et al., 2008). These results were confirmed in another study, which showed that activin/nodal signaling through Smad2/3 activation was necessary for maintaining the pluripotent status of rbESCs (Honda et al., 2009). These rbESCs did not colonize rabbit embryos after being injected into blastocysts (Honda et al., 2008). Honda et al. also established rabbit induced PSC lines [rabbit iPSCs (rbiPSCs)] from adult liver and stomach cells (Honda et al., 2010). Similar to rbESCs, rbiPSCs are dependent on FGF2 for self-renewal. Therefore, rbESCs and rbiPSCs seemed to exhibit the cardinal feature of primed pluripotency. However, this conclusion should be moderated because none of these studies evaluated these cell lines for other criteria that demarcate naïve and primed pluripotency; moreover, these studies did not compared these cell lines with rabbit inner cell mass (ICM) cells and PSCs from other species. Therefore, the status of rbESCs and rbiPSCs is yet to be thoroughly evaluated. In our study, we compared rbESCs and rbiPSCs at both molecular and functional levels and

concluded that (*i*) rbESCs do not exhibit all the characteristic features of pluripotency and (*ii*) rbiPSCs exhibit some characteristic features of naïve pluripotency.

Results

Derivation of FGF2-dependent rbESC lines

Twenty-four ICMs isolated from 52 blastocysts by immunosurgery were plated on feeder cells in rbESC medium supplemented with FGF2. Twelve of these ICMs could form outgrowths, of which 4 produced a population of highly proliferating cells that could be routinely passaged more than 40 times. These rbESC lines – designated rbES-4, rbES-8, rbES-18 and rbES-19 – formed flattened colonies of compact cells (Fig. 1A; supplementary material Fig. S1A). They were passaged every 3 days after collagenase II treatment of the colonies, followed by gentle dissociation into small clumps. All attempts to passage these cell lines after trypsinization into single-cell suspensions resulted in extensive differentiation and apoptosis (data not shown). All the 4 lines were positive for alkaline phosphatase activity (Fig. 1B; supplementary material Fig. S1A) and were strictly dependent on FGF2 for self-renewal, as determined by their altered morphology after FGF2 withdrawal for 24 h (Fig. 1C). Conventional Giemsa staining showed a normal chromosome number in all the selected lines (>50 metaphase spreads analyzed: 42XY) (Fig. 1D; supplementary material Fig. S1A). For rbES-18 line, the cells were karyotyped using G-banding, and normal chromosome complements were observed in the 4 analyzed metaphase spreads (Fig. 1E). Immunolabeling showed that all the 4 lines expressed *Oct4* in virtually every cell in the respective populations (Fig. 1F; supplementary material Fig. S3). All the 4 cell lines could undergo *in vitro* differentiation into embryoid bodies (EBs) (Fig. 1H). Differentiation was accompanied by the rapid loss of *Nanog* and *Oct4* expression and upregulation of the ectodermal marker *Nestin* and endodermal marker *Hnf3β*. The mesodermal marker *Flk1* was expressed at robust levels in undifferentiated cells (Fig. 1G). All the 4 rbESC lines could induce teratomas after being injected under the kidney capsules in SCID mice. All teratomas contained derivatives of the 3 embryonic germ layers (Fig. 1I,J; supplementary material Fig. S2A). Therefore, these 4 rbESC lines appeared to exhibit the characteristics of PSCs.

Generation of iPSC lines from adult rabbit fibroblasts

Adult rabbit fibroblasts (rbF) were infected twice at a 48-h interval with a mixture of 4 retroviral vectors that expressed human Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc transcription factors. Three days after the second infection, the rbFs were dissociated and replated on feeder cells in an rbESC medium supplemented with 10 ng/ml FGF2. The culture medium was changed every day thereafter until some colonies with compact morphologies appeared (Fig. 2A). One hundred and eleven clones were selected between the 15th and 29th day after fibroblast infection. These 111 clones were passaged by trypsin dissociation into single-cell suspensions. Twelve clones expressing alkaline phosphatase and capable of rapid proliferation were selected for further studies. At passage 6, 4 of these clones expressed rabbit *Nanog* and *Oct4* at the same level as that in rbESCs (Fig. 2B). For 3 clones – designated rbiPS-B19, rbiPS-B24 and rbiPS-B29 – silencing of all the 4 transgenes was achieved at passage 25 (Fig. 2C). Line rbiPS-B25 did not show suppressed *hc-MYC* transgene expression even after 25 passages and was excluded from all subsequent analysis. Withdrawal of FGF2 induced dramatic morphological changes within 48 h, suggesting differentiation (Fig. 2D). A normal chromosome number was observed in 2 lines – rbiPS-B19 and rbiPS-B29 (Fig. 2E; supplementary material Fig. S1B). For the rbiPS-B19 cell line, cells were karyotyped using G-banding, and normal chromosome complements were observed in the 20 analyzed metaphase spreads (Fig. 2F). The rbiPS-B24 cell line showed an abnormal 43XX karyotype. Immunolabelling showed that all the 3 cell lines expressed *Oct4* in virtually every cell in the respective populations (Fig. 2G; supplementary material Fig. S3). Differentiation induced by suspension culture resulted in the rapid loss of *Oct4* and *Nanog* expression (Fig. 2H). *HNF3β*, *Flk1* and *Nestin* were already expressed at robust levels in undifferentiated rbiPS-B19 cells. All the 3 lines induced teratomas containing cells that had differentiated into the 3 germ layers after being injected into SCID mice (Fig. 2I; supplementary material Fig. S2B). Most importantly, all iPSC lines could be routinely passaged every 2 days by trypsin dissociation into single-cell suspensions.

Contrasting expression patterns of stage-specific embryonic antigen (SSEAs) and cadherins

The patterns of stage-specific embryonic antigen (SSEA) expression differed between cell types, and all showed considerable heterogeneity. All the 3 rbiPSC lines showed heterogeneous expression of SSEA1, SSEA4, and TRA-1-60, whereas all the 4 rbESC lines expressed only SSEA1 (supplementary material Fig. S3). Distribution of SSEA1 and SSEA4 expression in various cell populations was quantified using flow cytometry (Fig. 3A). SSEA1 was expressed in 30–60% rbESCs and rbiPSCs, compared with 94% mESCs (Fig. 3B). SSEA4 was expressed in 10–40% rbiPSCs and the pattern was complex with these lines, which comprised 4 cell subpopulations: SSEA1^{+} (32–49%), SSEA4^{+} (5–12%), double-positive (7–26%), and double-negative (29–37%) cells (Fig. 3C). The distributions between these 4 sub-populations differed between lines and were constant over time in culture (data not shown). We determined whether these 4 populations represented 4 distinct cell types or whether they were capable of converting into each other in culture. To address this each subpopulation was sorted by FACS and subsequently cultured for 1 week (secondary cultures) before analysis by flow cytometry. The heterogeneity originally observed in the unsorted cell population was restored from each subpopulation (Fig. 3C). These results indicate that rbiPSCs existed in 4 interchangeable states (SSEA1^{+}/SSEA4^{+}, SSEA1^{-}/SSEA4^{+}, SSEA1^{+}/SSEA4^{-}, and SSEA1^{-}/SSEA4^{-}), and that the distribution of the 4 populations was cell line specific.

E-cadherin expression is observed in all PSCs regardless of species, whereas N-cadherin is expressed only in mouse Epiblast Stem Cells (EpiSCs) (Tesar et al., 2007). rbESC and rbiPSC lines had different patterns of E- and N-cadherin expression. Immunolabeling showed that all rbESC lines expressed both E- and N-cadherins similar to rhesus ESCs. In contrast, rbiPSC lines expressed only E-cadherin similar to mouse ESCs (Fig. 3D). Each SSEA subpopulation was sorted by FACS, and the expression of E-and N-cadherins was analyzed by qPCR. All subpopulations of rbiPSCs expressed *Cdh1* (E-cadherin) at levels 10- to 100-fold higher than those measured in rbESCs. In contrast, the same subpopulations expressed *Cdh2* (N-cadherin) at levels 10- to 100-fold lower than those measured in rbESCs (Fig. 3E). Therefore, differential expression of E- and N-cadherins was associated with

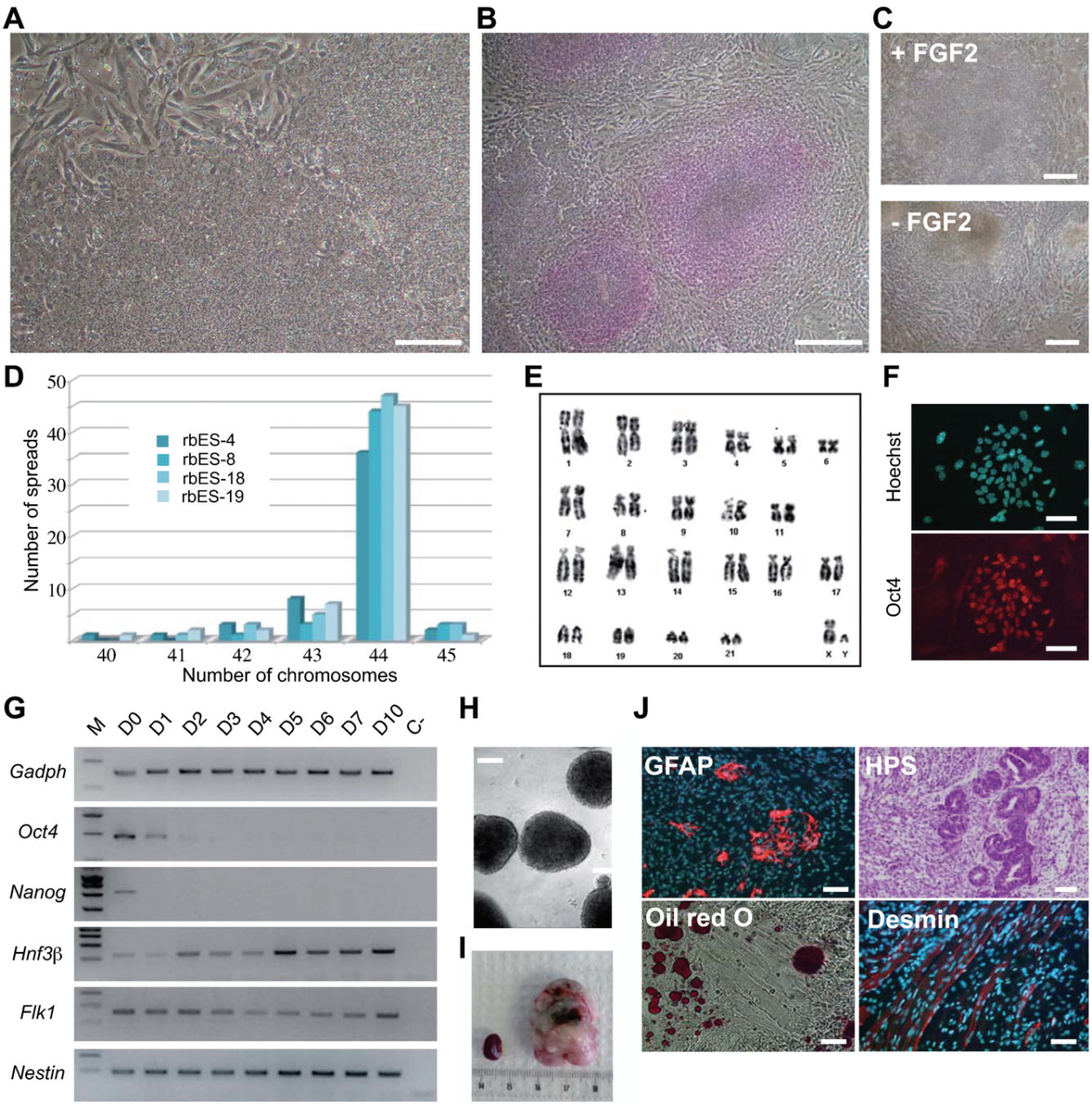


Fig. 1. Isolation and characterization of rbESC lines. (**A**) Phase-contrast image of rbES-18 cells at passage 28 (P28). (**B**) Alkaline phosphatase activity in rbES-18 cells. (**C**) Phase-contrast images of rbES-18 cells before and after FGF2 withdrawal for 24 h. (**D**) Histogram showing the distribution of chromosome numbers in rbES-4 at P13, rbES-8 at P17, rbES-18 at P15, and rbES-19 at P21. (**E**) G-banding karyotype of the rbES-18 line at P15. (**F**) Immunolabeling of rabbit Oct4. (**G**) RT-PCR analysis of pluripotency (*Nanog* and *Oct4*) and germ layer-specific (*Hnf3β*, *Flk1* and *Nestin*) gene expression during differentiation of rbES-18 cells induced by EB formation (days 0–10). (**H**) EB produced from rbES-18 cells. (**I**) Teratoma 31 days after injecting rbES-18 cells under the kidney capsule of SCID mice. (**J**) Histological section of the teratoma with tissue components of all 3 embryonic germ cell layers. Oil red O staining to detect adipocytes. Desmin and GFAP to detect muscle and glial cells, respectively. Gland structures could be identified after HPS staining. Scale bars: 50 µm.

the ESC *vs* iPSC status and not with the cell population heterogeneity observed as the SSEA expression.

Cell cycle characteristics demarcate the SSEA1^{+} rbiPS cells

PSCs show an unusual cell cycle structure that is characterized by a short G1 phase and a high proportion of cells in the S phase. In addition, they do not undergo cell-cycle arrest at the G1 checkpoint in response to DNA damage. Instead, they undergo growth arrest only at the G2 checkpoint (Aladjem et al., 1998; Fluckiger et al., 2006; Filipczyk et al., 2007). Therefore, we investigated whether rabbit PSCs displayed the same cell cycle characteristics. For the 4 rbESC lines, the G1, S, and G2/M phases were observed in 74±2.7%, 20±2.8%, and 6±2.9% cell populations, respectively. For the 3 rbiPSC lines, the G1, S, and G2/

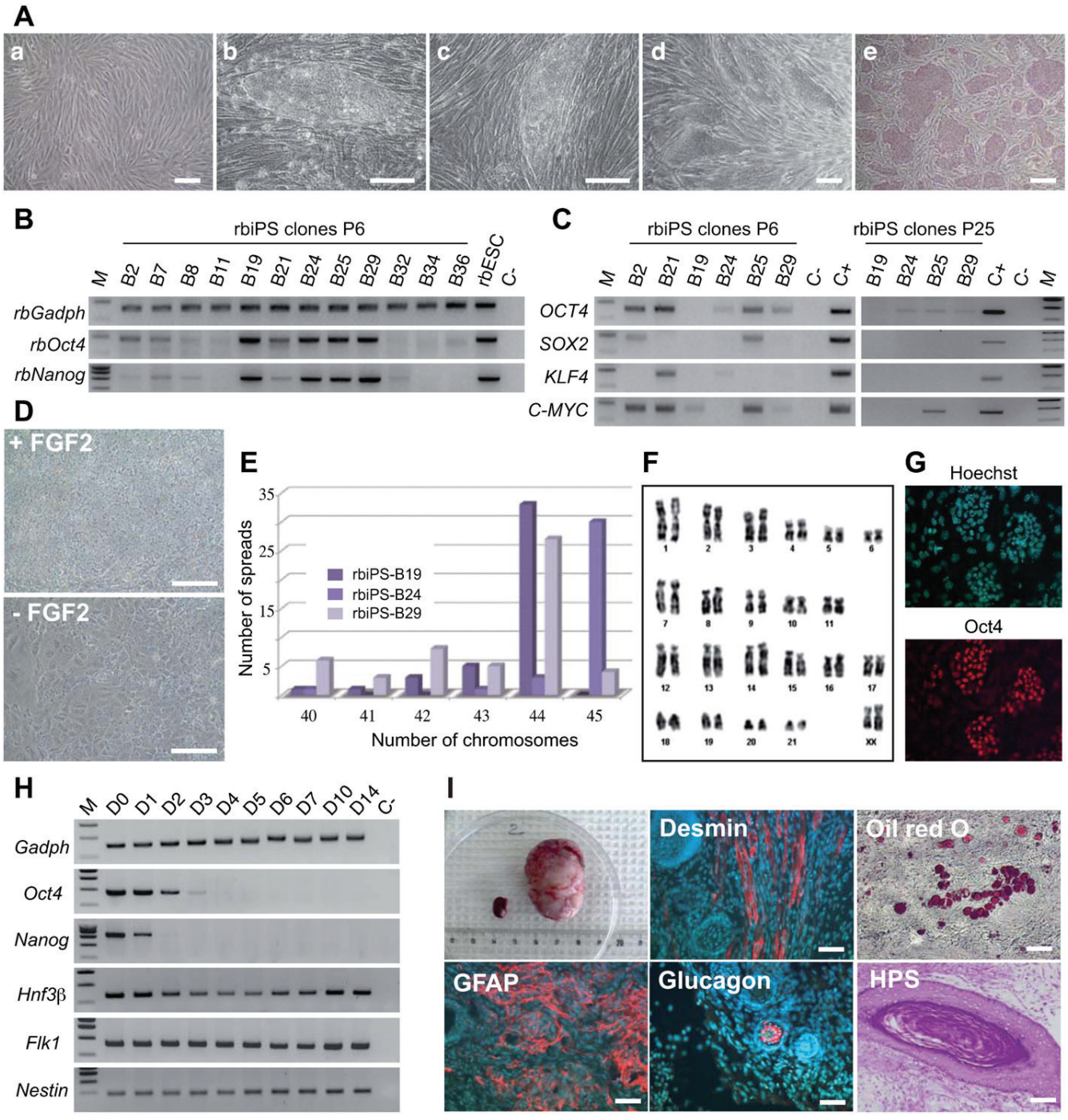


Fig. 2. Generation and characterization of rbiPSC lines. (**A**) Phase-contrast images of rbFs before (**a**) and after (**b–e**) infection with retroviral vectors expressing human transgenes; (b,c) primary colonies (P0) observed after 20 days of infection; (d) colonies observed at P6; (e) alkaline phosphatase activity at P6. (**B**) Expression of rabbit pluripotent genes *Oct4* and *Nanog* analyzed by RT-PCR in 12 independent rbiPSC clones at P6. (**C**) Expression of human transgenes analyzed by RT-PCR in 6 independent rbiPSC clones at P6 and P25. (**D**) Phase-contrast images of rbiPS-B19 cells before and after FGF2 withdrawal for 48 h. (**E**) Histogram showing the distribution of chromosome numbers in rbiPS-B19 at P37, rbiPS-B24 at P33, and rbiPS-B29 at P31. (**F**) G-banding karyotype of rbiPS-B19 line at P37. (**G**) Immunolabeling of rabbit Oct4. (**H**) RT-PCR analysis of pluripotency (*Nanog* and *Oct4*) and germ layer-specific (*Hnf3β*, *Flk1*, and *Nestin*) gene expression during differentiation of rbiPS-B19 cells induced by EB formation (days 0–14). (**I**) Teratoma at 30 days after injecting rbiPS-B19 cells under the kidney capsule of SCID mice, with tissue components of all the 3 embryonic germ cell layers. Histological section stained with HPS shows squamous epithelial cells. Oil red O staining to detect adipocytes. Desmin, GFAP, and glucagon to detect muscle, glial, and pancreatic α-cells, respectively. Scale bars: 50 μm.

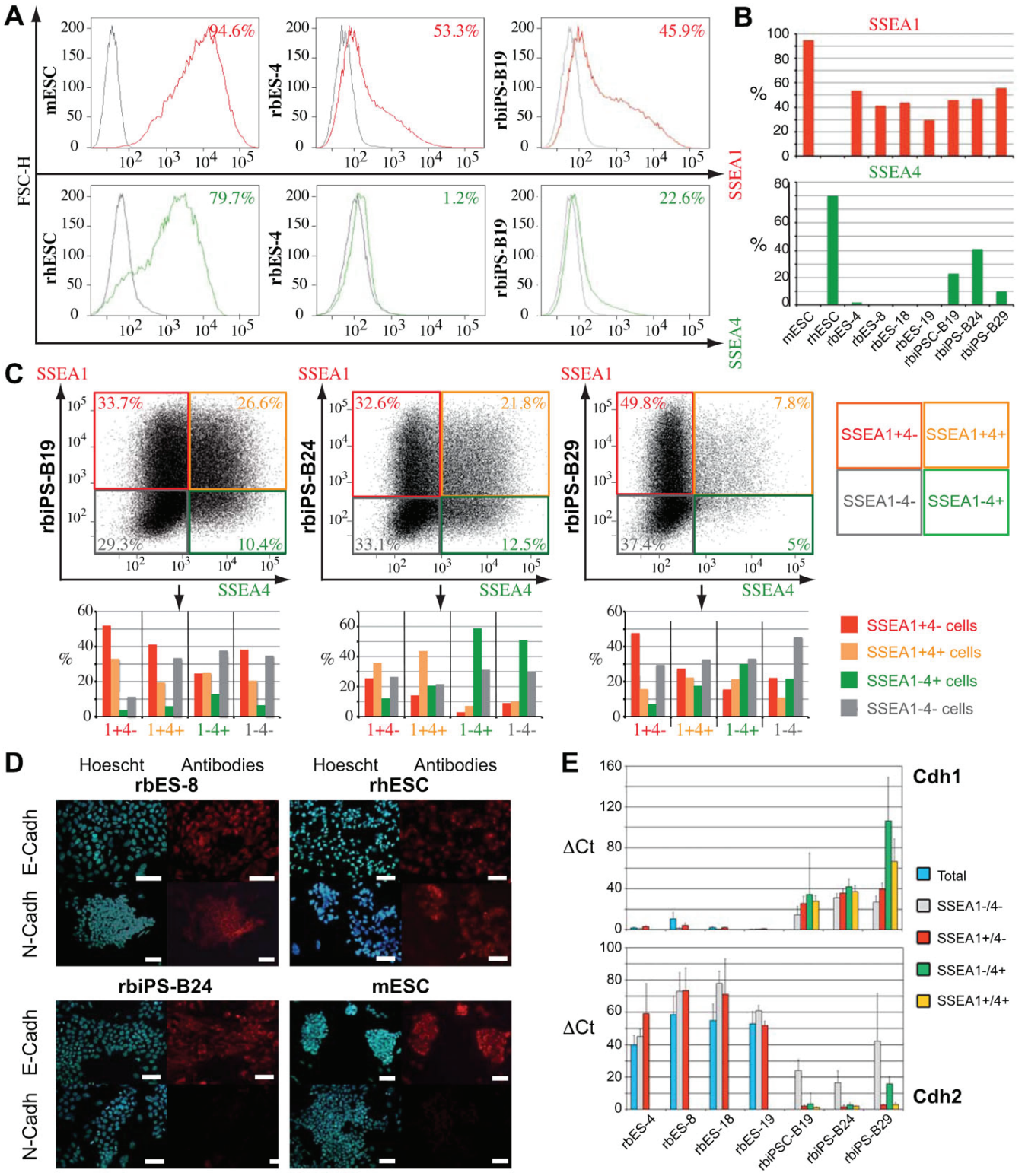


Fig. 3. Expression of SSEA antigens and cadherins. (**A**) Flow cytometry analysis of SSEA1 and SSEA4 marker expressions. (**B**) Histograms showing the percentages of SSEA1$^+$ and SSEA4$^+$ cells in various rbESC and rbiPSC lines. (**C**) Flow cytometry analysis of SSEA1 and SSEA4 marker expression in rbiPSC lines before and after FACS sorting of SSEA subpopulations. Upper panels: Dot plots of SSEA1- and SSEA4-associated fluorescence in rbiPS-B19, rbiPS-B24, and rbiPS-B29 lines before cell sorting. Bottom panels: Histograms showing the percentages of SSEA1$^+$/SSEA4$^-$ ($1^+/4^-$ cells), SSEA1$^+$/SSEA4$^+$($1^+/4^+$ cells), SSEA1$^-$/SSEA4$^+$($1^-/4^+$ cells), and SSEA1$^-$/SSEA4$^-$($1^-/4^-$ cells) populations; these cell populations were derived from cultures of rbiPS lines after sorting each cell population, replating in FGF2-supplemented medium, and subsequent culture for 7 days. (**D**) Immunolabeling with antibodies for E- and N-cadherins. (**E**) Histograms showing mRNA levels (ΔCt) of the E-cadherin (*Cdh1*) and N-cadherin (*Cdh2*) as analyzed by qPCR for the entire cell population (total) and in various SSEA subpopulations, as indicated. mRNA levels were normalized to the mRNA level of *Tbp*. Scale bars: 50 µm.

M phases were observed in 43±2.4%, 38±3.5%, and 19±1.9% cell populations, respectively (supplementary material Table S3). Thus, the percentage of rbPSCs in the S phase (20–38%) was higher than that in rbFs (7%) but lower than that in mESCs (68%), mEpiSCs (56%), and rhESCs (41%). The cell cycle distributions of the $SSEA1^+$ and $SSEA4^+$ subpopulations were also analyzed. Of all the analyzed cell lines, the $SSEA1^+$ subpopulations showed the lowest G1 and the highest S fractions than the $SSEA1^-$ and $SSEA4^+$ subpopulations. However, no $SSEA1^+$ subpopulation from any line analyzed showed a cell cycle distribution similar to that observed for $SSEA1^+$ mESCs (supplementary material Table S3).

To study the cell cycle response of rbPSCs to DNA damage, we analyzed the effects of doxorubicin, a DNA intercalator that induces double-strand breaks (Fig. 4). The G1 fraction of rbFs treated with doxorubicin for 24 h decreased from 80% to 41%, whereas the G2 fraction increased from 12% to 58%, indicating growth arrest in G1 and G2. In contrast, the G1 fraction of doxorubicin-treated mESCs decreased dramatically from 20% to 1%, whereas its G2 fraction increased from 11% to 99%, indicating a lack of G1 checkpoint in mouse PSCs and accumulation of cells at the G2 checkpoint. Similar results were obtained with rhESCs and mEpiSCs for which the G1 and S fractions virtually disappeared after doxorubicin treatment (Fig. 4A). The response of rbPSCs to doxorubicin treatment was more heterogeneous. They all showed moderate decreases in their G1 fractions (rbESCs, from 74% to 70%; rbiPSCs, from 43% to 20%) and significant increase in their G2 fractions (rbESCs, from 6% to 30%; rbiPSCs, from 19% to 80%). We assumed that this might be a reflection of the heterogeneity of rbPSC populations. Therefore, we analyzed the responses of different SSEA fractions to doxorubicin treatment. Only $SSEA1^+/SSEA4^-$ and $SSEA1^+/SSEA4^+$ subpopulations of rbiPSCs showed complete growth arrest in the G2 phase and did not show cell accumulation in the G1 phase; similar results were observed for mESCs, mEpiSCs, and rhESCs (Fig. 4A,B). All other fractions showed variable accumulation of cells in the G1 and G2 phases, as observed previously in the entire population. Of note, the $SSEA1^+$ subpopulation of rbESCs still showed accumulation in the G1 and G2 phases after doxorubicin treatment. Thus, these results indicate that only the $SSEA1^+$ subpopulation of rbiPSCs showed the cell cycle features of mESCs, mEpiSCs, and rhESCs (i.e. a shortened G1 phase, a high proportion of cells in the S phase, and absence of DNA damage checkpoint in G1). Neither the $SSEA1^+$ subpopulation of rbESCs nor the other subpopulations of rbiPSCs showed the cell cycle features of PSCs.

Mouse *Oct4* promoter activity and DNA methylation demarcates rbESC and rbiPSC lines

The distal element (DE) of *Oct4* enhancer showed robust activity in ICM cells of mouse blastocyst, primordial germ cells, and mESCs. In contrast, it is minimally active in the epiblast of mouse postimplantation embryo and its EpiSC derivatives (Yeom et al., 1996; Tesar et al., 2007). Thus, DE activity can be used to discriminate between the naïve and primed states of pluripotency (Nichols and Smith, 2009). To evaluate the DE activity in rabbit preimplantation embryos, we used the L-SIN-EOS-C(3)-EiP lentiviral vector (designated EOS) that expressed GFP and the puromycin resistance gene under the transcriptional control of the minimal early transposon promoter and trimer of the CR4 enhancer (Hotta et al., 2009). The CR4 enhancer is a 146-bp fragment of the mouse DE element that recruits the Oct4, Sox2, and Sp1 transcription factors and recapitulates the regulation of the DE element in pluripotent and differentiated cell lines (Okumura-Nakanishi et al., 2005). A vector expressing GFP from the ubiquitous CAG promoter [GAE-CAG-eGFP/wpre, (Mangeot et al., 2002)] – designated GAE – was used as a control. Both lentiviral vectors were concentrated and injected under the zona pellucida of 8-cell-stage rabbit embryos. The embryos were then cultured to the mid-blastocyst stage before analysis with confocal microscopy. Fluorescent cells were observed in the trophoblast and ICM, with both control and EOS lentivectors, indicating the activity of the trimer of the CR4 enhancer in rabbit preimplantation embryos (Fig. 5A,B). DE activity in the trophoblast cells was consistent with previous observations, indicating that *Oct4* was expressed in the trophoblast of the rabbit blastocyst (Kobolak et al., 2009).

To evaluate the DE activity in rabbit PSCs, rbESC, and rbiPSC lines were infected with EOS and GAE lentivectors and analyzed using flow cytometry after 4 days (Fig. 5C; supplementary material Fig. S4A). All cell lines infected with GAE showed green fluorescence ranging from 12% to 54% of positive cells according to the cell type (threshold set at 2.5×10^2). Approximately 60–95% of these GFP-positive cells showed fluorescence levels of $\geqslant10^3$. In contrast, fluorescence levels in EOS-infected cells varied dramatically between cell types. mESCs had the highest level (76% GFP-positive cells had fluorescence levels of $>10^3$). mEpiSCs showed no expression while rhESCs showed low expression (only 13% GFP-positive cells had fluorescence levels of $>10^3$). This indicates that rbESCs and iPSCs showed intermediate expression levels (rbES-4, 32%; rbES-8, 33%; rbES-19, 30%; rbiPS-B19, 42%; rbiPS-B24, 41%; and rbiPS-B29, 48%; Fig. 5C; supplementary material Fig. S4A). This suggested that the trimer of the CR4 enhancer was more active in rbPSCs than in mouse EpiSCs and primate ESCs.

The GFP expression level in EOS-infected cells was influenced by the infection rate. Therefore, to eliminate the confounding effect of the variations in infection rates between the cell lines, we calculated an expression index (I_E): $I_E = \frac{\%GFP^+_{\geq 10^3}}{\%GFP^+_T} \times \%I_R$. $\%GFP^+\geqslant10^3$ is the percentage of GFP^+ cells with expression levels of $\geqslant10^3$; $\%GFP^+_T$ is the percentage of all GFP^+ cells; and I_R is the percentage of infected cells. Comparison of I_E values between cell lines showed that mESCs had the highest index, whereas rhESCs and EpiSCs had the lowest index. As determined from previous calculations, I_E of all rabbit lines was between that of mESCs and rhESCs, with all the 3 iPSCs lines showing higher I_E indices than the 3 ESC lines (Fig. 5D). From these experiments, we concluded that compared with rbESCs, rbiPSC lines could activate the *mOct4* DE element at a higher level.

This conclusion was strongly reinforced by the results of puromycin selection of EOS-infected cells. All ESC and iPSC lines infected with EOS were cultured for 7 days in a medium supplemented with puromycin. Puromycin-resistant cells could be readily selected and expanded from mESCs and the 3 rbiPSC lines (designated rbiPS-B19-EOS, rbiPS-B24-EOS, and rbiPS-B29-EOS) (Fig. 5E). In contrast, no puromycin-resistant cells could be isolated from any of the rbESC lines infected with the EOS lentivector. Therefore, we concluded that only iPSCs could

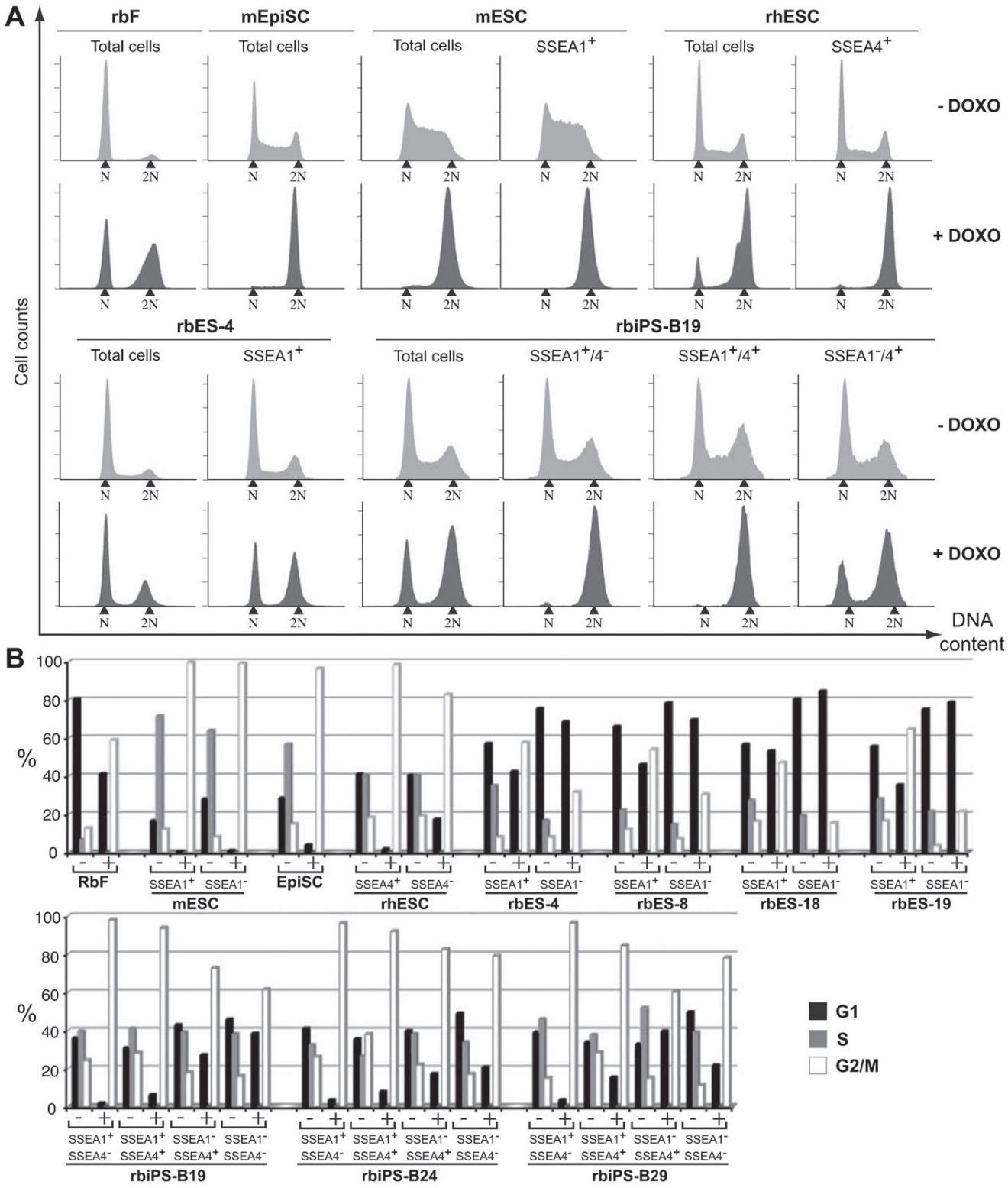


Fig. 4. Cell cycle analysis of rabbit PSCs. (**A**) Cell cycle profiles of rbFs, EpiSCs, mESCs, rhESCs, rbES-4, and rbiPS-B19 assessed using flow cytometry after staining with propidium iodide. Cell cycle distributions are shown for the total cell population and different SSEA subpopulations. + DOXO indicates treatment with 50 ng/ml doxorubicin for 24 h. (**B**) Histograms showing the percentage of cells in the G1, S, and G2/M phases of the cell cycle before and after doxorubicin treatment for different SSEA subpopulations. The percentages were calculated using ModFitLT.

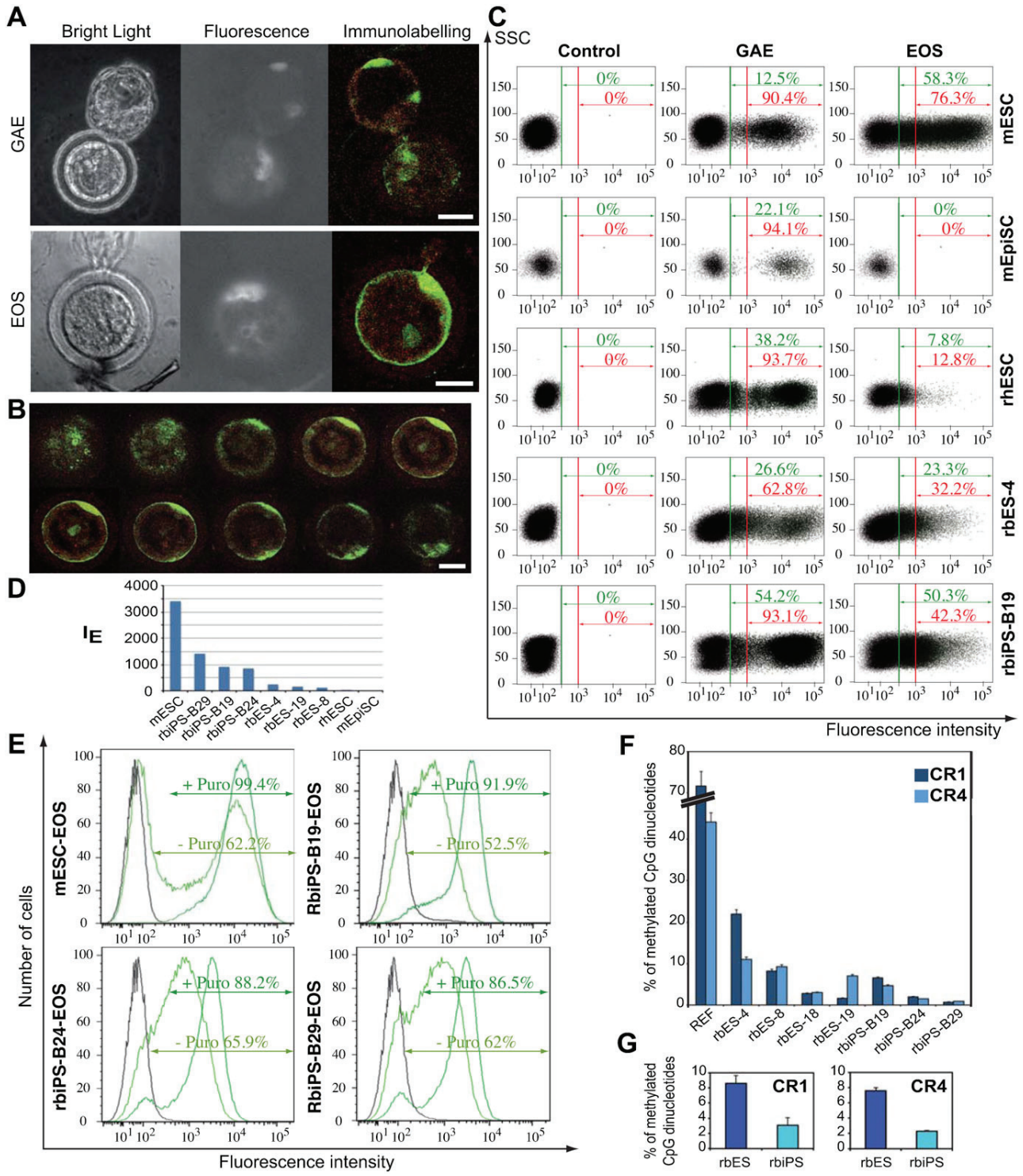


Fig. 5. Activity and methylation of mouse *Oct4* promoter in rabbit PSCs. (**A**) GFP immunolabeling of rabbit mid-stage blastocysts after injecting GAE and EOS lentivectors under the zona pellucida of 8-cell-stage embryos. (**B**) Serial confocal images of a blastocyst expressing EOS lentivector after GFP immunolabeling and costaining with propidium iodide. (**C**) Flow cytometry analysis of rbES-4, rbiPS-B19, mESCs, mEpiSCs, and rhESCs 4 days after infection with GAE and EOS lentivectors. For each dot plot, the numbers in green indicate the percentages of all GFP^+ cells. Numbers in red indicate the percentages of GFP^+ cells that had a fluorescence level of $\geqslant 10^3$ and which were normalized to the percentage of all GFP^+ cells. (**D**) Histogram showing the results for GFP expression index: $I_E = \frac{\%GFP^+_{\geq 10^3}}{\%GFP^+_T} \times \%I_R$. (**E**) Flow cytometry analysis of mESC-EOS, rbiPS-B19-EOS, rbiPS-B24-EOS, and rbiPS-B29-EOS before (− Puro) and after (+ Puro) selection with puromycin for 14 days. (**F**) Histogram showing the percentages of methylated CpG dinucleotides evaluated after bisulfite genomic sequencing of the *Oct4* promoter regions (CR1 and CR4) in all rabbit PSC lines and REFs. (**G**) Histogram comparing the percentages of methylated CpG dinucleotides between rbESCs and rbiPSCs in CR1 or CR4 region. Statistical analyses were conducted using analysis of variance followed by Fisher's test. Differences were considered significant for $P<0.01$. Scale bars: 50 µm.

activate the trimer of the CR4 enhancer at a level sufficient to confer resistance to puromycin. This conclusion was supported by the observation that the mean intensity of GFP fluorescence increased during puromycin selection of iPSCs infected with EOS, suggesting that only some rare cells expressing GFP at high levels were resistant to puromycin and expanded during selection. These puromycin-resistant cells had notably higher percentages of $SSEA1^+$ and $SSEA4^+$ cells than the original cells (i.e. before puromycin selection) (supplementary material Fig. S4B).

Regions CR1 and CR4 were chosen for the methylation study. Bisulfite genomic sequencing showed that both regions were 3–10 times more methylated in rabbit embryonic fibroblasts (REFs) than in rabbit PSCs (Fig. 5F; supplementary material Fig. S5). Regions CR1 and CR4 were less methylated in rbiPSCs than in rbESCs [CR1: 3.1% methylated CpG dinucleotides in rbiPSCs *vs* 8.6% in rbESCs ($P<0.01$); CR4: 2.3% methylated CpG dinucleotides in rbiPSCs *vs* 7.6% in rbESCs ($P<0.001$)] (Fig. 5G; supplementary material Fig. S5).

Gene expression profiling demarcates rbESC and rbiPSC lines

To further define the molecular properties of rbESCs and rbiPSCs, we purified the $SSEA1^+/SSEA4^-$, $SSEA1^+/SSEA4^+$, and $SSEA1^-/SSEA4^-$ subpopulations by FACS sorting in 4 rbESC lines and 2 rbiPSC lines and performed a global analysis of their expression profiles. For this, we used a rabbit-specific gene expression microarray containing approximately 13,000 independent genes. For each cell line (rbES-4, rbES-8, rbES-18, and rbES-19; rbiPS-B19 and rbiPS-B29) and SSEA subpopulations, 3 biological replicates were hybridized to the customized rabbit array. Hierarchical clustering of the normalized data showed that all subpopulations of rbESC lines were clustered on one side and all subpopulations of rbiPSC lines were clustered together on the other (Fig. 6A). This indicates that despite the heterogeneity observed in the cell lines, the variability is mainly associated with the cell status (rbESC *vs* rbiPSC) and not with the SSEA expression status.

To further examine the transcriptome of various rbESC and rbiPSC subpopulations, we examined the expression of rabbit homologs of 22 mouse genes [*Blimp1*, *Cdx2*, *Cdh1 (E-cadherin)*, *Cdh2 (N-cadherin)*, *Cldn6*, *Dax1 (NrOb1)*, *Dazl*, *Essrb*, *Fbxo15*, *Fgf4*, *Gbx2*, *Klf4*, *Lefty2*, *Nanog*, *Oct4* (*Pou5f1*), *Otx2*, *Pecam1*, *Pitx2*, *Piwil2*, *Rex1 (Zfp42)*, *Tbx3*, and *Tcfcp2l1*], the mRNA levels of which have been used to evaluate stemness and demarcate the naïve and primed pluripotent states in rodent cells (Tesar et al., 2007; Bao et al., 2009; Hanna et al., 2010; Tang et al., 2010; Wang et al., 2012). Of note, 12 genes (*Klf4*, *Cldn6*, *Otx2*, *Nanog*, *Oct4*, *Cdx2*, *Dazl*, *Rex1*, *Fbxo15*, *Pitx2*, *Tbx3*, and *Gbx2*) were represented on the microarray. The expression levels of these 22 genes were determined by qPCR for the $SSEA1^+/SSEA4^-$, $SSEA1^+/SSEA4^+$, $SSEA1^-/SSEA4^+$, and $SSEA1^-/SSEA4^-$ subpopulations purified from the 4 rbESC and 3 rbiPS lines (supplementary material Table S4; Fig. S6; Fig. 3E). In agreement with the microarray data, correlation clustering of the ΔCt values showed that the rbiPSC subpopulations showed fewer differences between them than with the rbESC subpopulations (Fig. 6B). To determine which genes accounted for the variations between rbESCs and rbiPSCs, PCA was performed from the qPCR data obtained with the $SSEA1^+/SSEA4^-$ and $SSEA1^+/SSEA4^+$ subpopulations (Fig. 6C). The first 2 principal components had 78% of the total variation. The first axis that represented 56% of the total variability distinguished between rbESC and rbiPSC lines in accordance with correlation clustering analysis. The second axis represented 22% of the total variability and accounted for variability between cell lines. A graphical representation of gene dispersion in a trigonometric circle highlighted 2 clusters of genes: the first comprised *Cdh2*, *Gbx2*, and *Dax1* and the second comprised *Otx2*, *Pitx2*, *Cldn6*, *Cdh1*, *Essrb*, *Klf4*, *Dazl*, *Oct4*, *Piwil2*, *Nanog*, and *Pecam1* (Fig. 6D). Both clusters were clearly anticorrelated over the cell lines, indicating that their relative expression levels were mutually exclusive. Both clusters appeared to be representative because most of the distances between the origin and the projected variables were globally close to the maximum distance (i.e. 1). Thus, these 14 genes explained most of the variability observed between rbESCs and rbiPSCs (first axis in Fig. 6C). The other 8 genes (*Fgf4*, *Cdx2*, *Rex1*, *Tcfcp2l1*, *Lefty2*, *Fbxo15*, *Tbx3*, and *Blimp1*) mostly accounted for the variability observed between lines in each group (2^{nd} axis Fig. 6D).

rbiPSCs are closer to ICM cells

We next examined which cell types (rbESCs *vs.* rbiPSCs) and which subpopulations ($SSEA1^+$ *vs.* $SSEA4^+$ *vs.* $SSEA^-$) showed the closest proximity to ICM cells of the rabbit embryo. To this end, the expression of the 22 genes was measured in the ICM of third-day rabbit mid-blastocysts (supplementary material Table S4) and compared to the expression measured in the rbESC and rbiPSC subpopulations. Calculation of the Euclidean distances between the ICM sample and each subpopulations showed that $SSEA1^+$ rbiPSCs were the closest to the ICM and the $SSEA1^-$ rbiPSCs were the farthest (Fig. 7A). Interestingly, all rbESC subpopulations, irrespective of their SSEA1 status, were more distantly related to the ICM than the $SSEA1^+$ rbiPSCs. The relative proximity of the $SSEA1^+$ rbiPSCs with the ICM could be further evidenced in a rank histogram of the relative expression level of the 22 genes (Fig. 7B,C). The RNA level of each gene in ICM cells were normalized to the mRNA level of *Tbp*, and the resultant ΔCt was ranked from the highest (*Oct4*: $\Delta Ct=37.5$) to the lowest (*Dax1*: $\Delta Ct=0.0013$). Most genes that were strongly expressed in rbiPSCs than in rbESCs (*Oct4*, *Cdh1*, *Essrb*, *Cldn6*, *Nanog*, *Klf4*, *Otx2*, *Dazl*, *Pitx2*, *Piwil2*, *Pecam1*; $P<0.05$) were highly expressed in the ICM ($\Delta Ct>1$). In contrast, genes that were strongly expressed in rbESCs (*Cdh2*, *Gbx2*, *Dax1*; $P<0.05$) were expressed at low levels in the ICM ($\Delta Ct<0.1$). Taken together, these results indicate that the gene expression profile of $SSEA1^+$ rbiPSCs best matched that of the ICM cells of rabbit preimplantation embryo.

Colonization of pre-implantation embryos by rbESCs and rbiPSCs

To evaluate the capacity of rbESCs to colonize pre-implantation embryos and contribute to the formation of ICM, 5–10 rbES-18 cells that expressed GFP were injected under the zona pellucida of 20 eight-cell-stage rabbit embryos. Of note rbES18 was derived from a GFP transgenic embryo (Al-Gubory and Houdebine, 2006) and GFP was expressed by all cells in this population (Fig. 8A). In a parallel experiment, rbES-18 $SSEA1^+$ cells were sorted by FACS and then injected into 67 eight-cell-stage embryos. All embryos were cultured until they reached the mid-blastocyst stage prior to GFP immunostaining and analysis by confocal microscopy (supplementary material Table S5; Fig. 8B). No GFP-expressing cells were observed in the 74

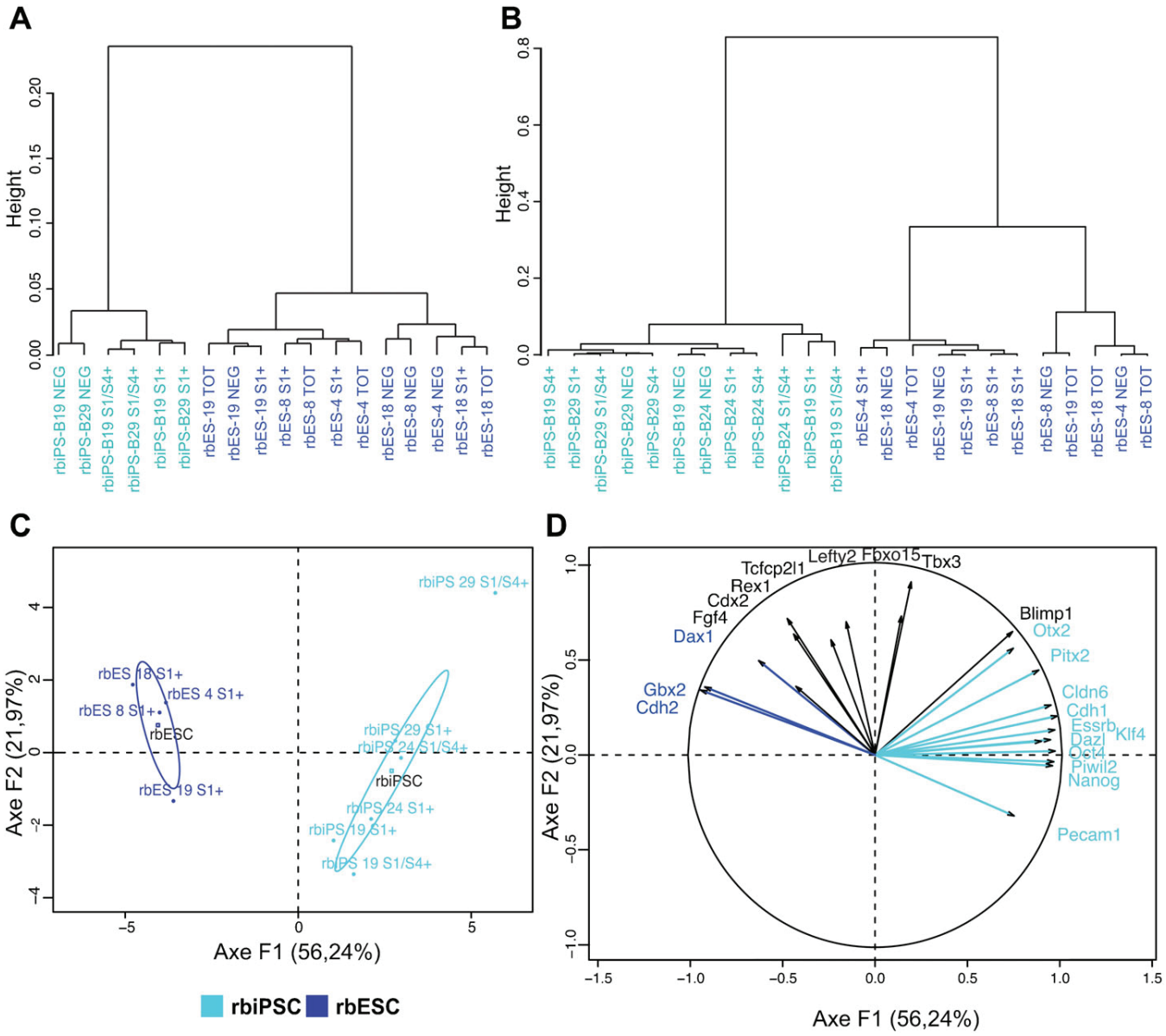


Fig. 6. Gene expression analysis for rbESCs and rbiPSCs. (**A**) Hierarchical clustering of transcriptome data (mean values/cell category) using Pearson correlation coefficient as a measure of distance between samples. (**B**) Correlation clustering for SSEA subpopulations of rbESCs and rbiPSCs ($S1^+$: $SSEA1^+/SSEA4^-$; $S4^+$: $SSEA1^-/SSEA4^+$; $S1/S4^+$: $SSEA1^+/SSEA4^+$; NEG: $SSEA1^-/SSEA4^-$; TOT: total population) based on the RNA levels of the 22 genes (*Blimp1*, *Cdx2*, *Cdh1*, *Cdh2*, *Cldn6*, *Dax1*, *Dazl*, *Essrb*, *Fbxo15*, *Fgf4*, *Gbx2*, *Klf4*, *Lefty2*, *Nanog*, *Oct4*, *Otx2*, *Pecam1*, *Pitx2*, *Piwil2*, *Rex1*, *Tbx3*, and *Tcfcp2l1*) measured by qPCR. mRNA levels were measured in 3 biological replicates and 3 technical repeats, and normalized to *Tbp* expression levels. (**C**) Graphical representation of the first principal component of PCA for $SSEA1^+(S1^+)$ and $SSEA1^+/SSEA4^+(S1/S4^+)$ subpopulations based on the RNA levels of the 22 genes that discriminated the 2 groups of relatively closer cell types. (**D**) Graphical representation of the first principal component of PCA for the 22 genes in a trigonometric circle that discriminated the 2 groups of anticorrelated genes (shown in dark blue and cyan).

embryos that had successfully developed to the blastocyst stage. In contrast, when 5–10 mES GFP^+ cells (line CGR8-GFP) were injected into rabbit embryos at the same stage, all the resulting blastocysts (15) exhibited extensive colonization of ICM (Fig. 8C). Thus, rabbit early-cleavage-stage embryos were permissive to colonization by naïve mESCs but not by rbESCs.

We performed a similar experiment with rbiPS-B19 line. First, rbiPS-B19 cells were infected with the GAE lentivector that expressed GFP under the CAG promoter. GFP^+ cells were sorted by FACS and then injected into 47 eight-cell-stage rabbit embryos. All developed to the blastocyst stage, but only one embryo exhibited GFP^+ cells in the ICM and in the trophoblast. Similarly, $SSEA1^+$ rbiPS-B19-GFP cells were sorted prior to injection into 65 eight-cell-stage embryos. Only one blastocyst had GFP^+ cells in the ICM after GFP immunostaining (Fig. 8D).

We thought that isolated rbiPSC survival would be very poor after injecting them into eight-cell-stage embryos and that this could explain the low rate of chimaeric blastocysts that was observed. To bypass the dissociation step, we generated aggregation chimaeras with 8-cell-stage embryos. Of note, this

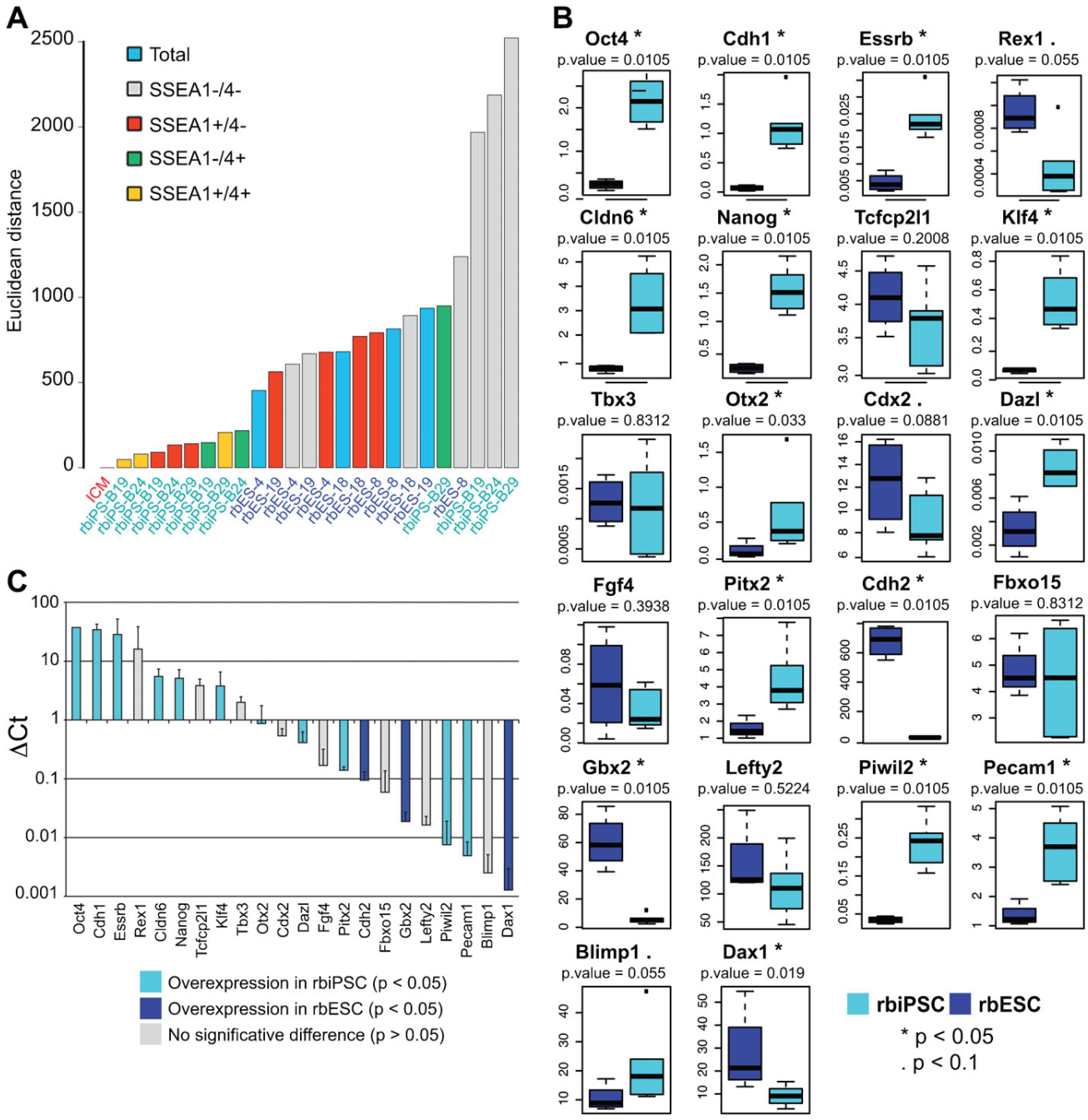


Fig. 7. Gene expression profiling in rbESCs and rbiPSC *vs.* ICM cells. (**A**) Histogram showing the Euclidean distances between the ICM cells and each subpopulations, as determined from the expression profiles of the 22 genes. Euclidean distances correspond to the value of a vectorial distance in a multidimensional orthonormal basis (the number of dimensions is the number of genes analyzed). An Euclidean distance *D* for a PSC subpopulation *a* was calculated using the following formula: $D=\sqrt{\left[(x_a-1)^2+(y_a-1)^2+\ldots+(n_a-1)^2\right]}$ (1). x_a, y_a, and n_a represent the relative expression of each gene (*x*, *y*, and *n*) calculated by qPCR for the PSC subpopulation line *a*. (**B**) Histogram showing the ΔCt values calculated for each of the 22 genes in the SSEA1$^+$ rbESCs (dark blue bars) and SSEA1$^+$ rbiPSCs (cyan bars). (**C**) Histogram showing the ΔCt values calculated for each of the 22 genes in the rabbit ICM, normalized to the mRNA level of *Tbp* gene (ΔCt=1) and ranked from the highest (left) to the lowest (right). Cyan bars: genes highly expressed in rbiPSCs, as calculated in panel B; dark blue bars: genes highly expressed in rbESCs; grey bars: genes equally expressed in rbiPSCs and rbESCs.

technique requires removal of the mucous coat, which prevents embryo implantation into the uterus after transfer to surrogates (Murakami and Imai, 1996). For this goal, rbiPS-B19 cells were infected with ABP-RP-TLCLACZL, a lentiviral vector that expressed the lacZ gene under the control of the EF1α promoter. Viable β-galactosidase$^+$ cells were isolated by iterative FACS sorting until a population of rbiPS-B19 cells that expressed β-galactosidase at a robust level could be stably expanded. The rbiPSC-B19-LacZ cells were subsequently infected with the EOS lentivector and selected with puromycin

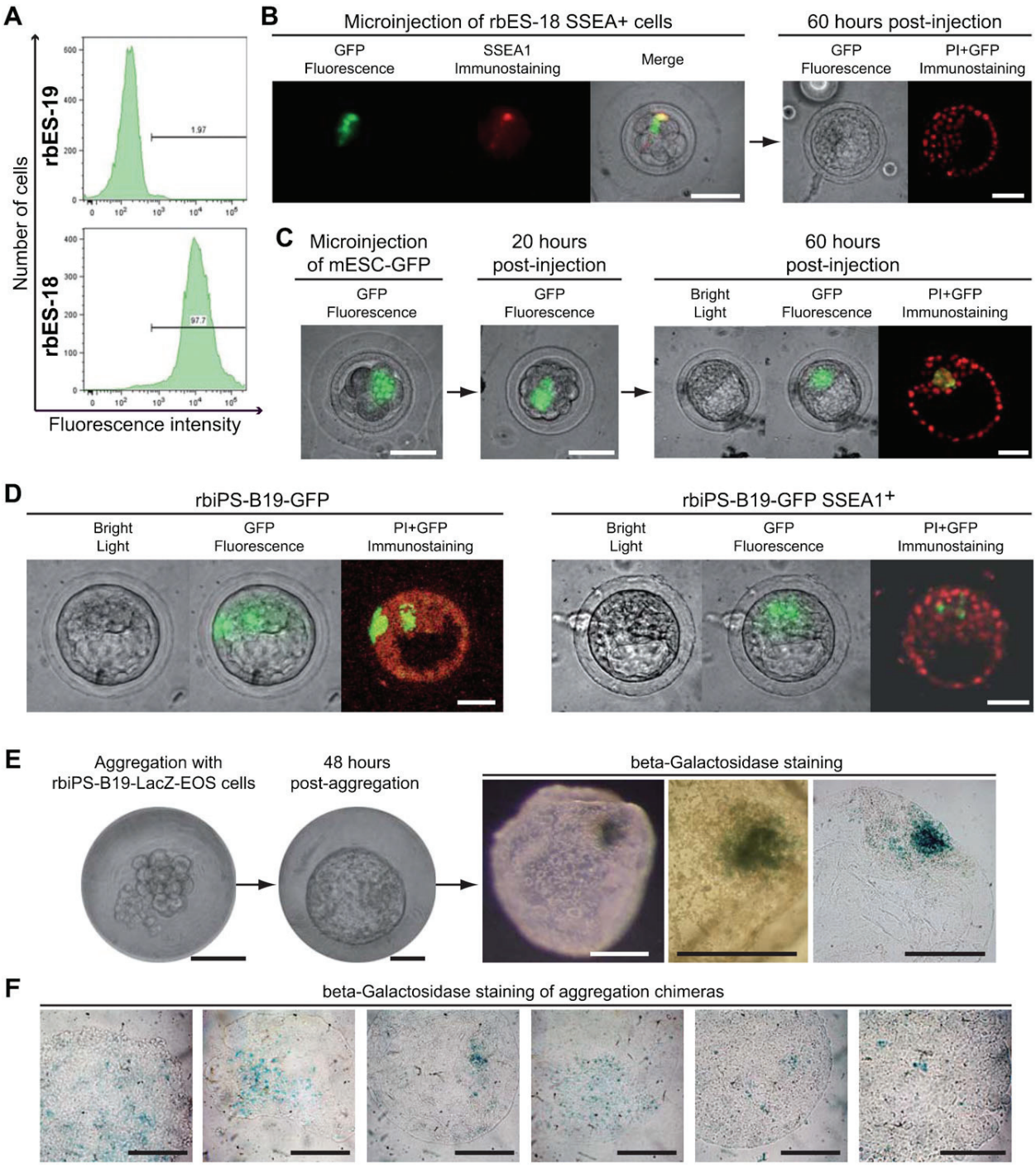


Fig. 8. Colonization of pre-implantation embryos. (**A**) Flow cytometry analysis of GFP expression in rbES-18 and rbES-19 cells derived from GFP-transgenic and non-transgenic blastocysts, respectively. (**B**) Microinjection of SSEA1^{+} rbES-18 cells into eight-cell-stage embryos and observation of developing embryos at the blastocyst stage. (**C**) Microinjection of mESCs (CGR8-GFP line) into rabbit eight-cell-stage embryos and observation of developing embryos at morula and blastocyst stages. (**D**) Observation of blastocyst-stage embryos resulting from the microinjection of rbiPS-B19-GFP and rbiPS-B19-GFP SSEA1^{+} cells into eight-cell-stage embryos. (**E**) Left panels: Phase-contrast images showing aggregation of an eight-cell-stage embryo with a clump of rbiPS-B19-LacZ-EOS cells, and the resulting blastocyst after *in vitro* culture for 48 hours. Right panels: β-galactosidase activity in the ICM of the blastocyst. (**F**) β-galactosidase activity in blastocysts resulting from aggregation of eight-cell-stage embryos with a clump of rbiPS-B19-LacZ-EOS cells and subsequent *in vitro* culture for 48 hours. Scale bars: 50 µm.

to generate a homogenous population of *mOct4* DE-positive cells (not shown). Clumps of 20–25 resulting rbiPSC-B19-LacZ-EOS cells were aggregated in the zona pellucida- and mucous coat-free 8-cell-stage embryos and were subsequently cultured to the mid-blastocyst stage. We obtained 62 blastocysts, of which 10 had β-galactosidase^{+} cells in the ICM. In one case, the ICM

was heavily colonized by β-galactosidase$^+$ cells (Fig. 8E,F; supplementary material Table S5).

Discussion

Using the molecular and functional criteria that characterize pluripotency in rodents and primates, we demonstrated that rbESCs and rbiPSCs show some key differences. First, similar to mECSs, rbiPSCs are resistant to trypsinization to single-cell suspensions, a procedure that induces extensive cell death and differentiation when applied to rbESCs, mouse EpiSCs (Tesar et al., 2007), and primate ESCs (Wianny et al., 2008). Second, similar to mESCs, rbiPSCs express elevated levels of E-cadherin, whereas rbESCs express both E- and N-cadherins similar to mouse EpiSCs and primate ESCs (Tesar et al., 2007; Hawkins et al., 2012). Third, the cell cycle of rbESCs had a longer G1 phase than the S and G2 phases and similar to somatic cells, they undergo growth arrest in the G1 phase after DNA damage. This is in sharp contrast to the SSEA1$^+$ rbiPSCs as well as to all mouse and primate PSCs examined until date, which have a relatively short G1 phase and lack a DNA damage checkpoint in the G1 phase (Aladjem et al., 1998; Hong and Stambrook, 2004; Fluckiger et al., 2006; Filipczyk et al., 2007; Momcilovic et al., 2010). Fourth, the CR4 element of the mouse *Oct4* DE exhibits a more robust activity in rbiPSCs than in rbESCs. High CR4 element activity is observed in mESCs, whereas low activity is observed in mouse EpiSCs (Tesar et al., 2007). Fifth, the *Oct4* promoter is less methylated in the rbiPSCs than in the rbESCs. Sixth, rbESCs and rbiPSCs show distinct gene expression profiles. We identified 14 genes whose activity is different between rbiPSCs and rbESCs. Similar to that in mESCs, *Essrb*, *Klf4*, *Piwil2*, *Cdh1*, *Dazl*, and *Pecam1* are strongly expressed in rbiPSCs; however, they are expressed at low levels in rbESCs. Last, based on the expression of the 22 selected genes, rbiPSC lines are the closest to rabbit ICM, whereas the profiles of all rbESC lines are the farthest. Taken together, it can be concluded that rbiPSCs show many characteristic features of naïve pluripotency as defined in rodents, i.e. resistance to single-cell dissociation, no expression of N-cadherin, robust activity of the distal enhancer of mouse *Oct4*, and robust expression of ICM-specific markers. However, rbiPSCs do not show all the attributes of naïve pluripotency. For instance, they exploit FGF2 signaling for self-renewal, an attribute of primed pluripotency (Nichols and Smith, 2009). In addition, they do not express all the molecular markers of naïve pluripotency, including *Rex1*, *Tbx3*, *Gbx2*, *Fgf4*, and *Dax1* (Tesar et al., 2007). Furthermore, they show a reduced capacity to colonize the ICM after injection into rabbit blastocysts. Based on these observations, we propose that rbiPSCs self-renew in an intermediate state between naïve and primed pluripotency. Such an intermediate state may resemble the intermediate epiblast stem cells (IESCs) recently described in the mouse (Chang and Li, 2013). Like IESCs, rbiPSCs express *Rex1* (naïve pluripotency marker) and *Otx2* (primed pluripotency marker) at low levels, and express *Pecam1* (naïve pluripotency marker) and *Pitx2* (primed pluripotency marker) at high levels. Moreover, both rbiPSCs and IESCs can colonize the ICM after aggregation with morulas. In the case of IESCs, the IESC-derived ICM cells failed to contribute to post-implantation development. In the case of rbiPSCs, we could not address this question because the morula aggregation technique requires removal of the mucin coat, which prevents embryo implantation into the uterus after transfer to surrogates (Murakami and Imai, 1996). However, the growth requirements of IESCs and rbiPSCs seem different. IESCs, which grow on gelatin, respond either to LIF or to activin to self-renew in the undifferentiate state. By contrast rbiPSCs grow on feeders and are strictly dependent on FGF2 signalling. Nevertheless, the possibility remains that rbiPSCs could also be dependent on LIF produced by feeder cells.

We have shown that rbESCs do not show all the attributes of pluripotent stem cells. In particular, they have a DNA damage checkpoint in the G1 phase like somatic cells. It is generally assumed that shortening the G1 phase sustains the pluripotent state by restricting the window of opportunity for differentiation cues (Mummery et al., 1987; Burdon et al., 2002; Sela et al., 2012; Coronado et al., 2013). In *bona fide* pluripotent stem cells, the lack of a DNA damage checkpoint in G1 might further reduce this window by preventing growth arrest at a critical point for self-renewal. Thus, rbESCs lack some key features of the pluripotent cell cycle, which might explain why they exhibit such a low proliferation rate and high spontaneous differentiation rate than rbiPSCs and primate ESCs.

To conclude, we have reported the first PSC lines in a non-rodent species that show characteristics of naïve pluripotency. These cells represent a first step towards genome engineering and production of germline chimeras in rabbits.

Materials and Methods

Rabbit breeding

Sexually mature New Zealand White rabbits were purchased from Hycole (Marcoing, France) or HyPharm (Roussay, France). Superovulations of females were induced as described previously (Salvetti et al., 2010). Sixty hours after artificial insemination, the fertilized embryos were flushed from explanted oviducts using Euroflush® (IMV Technologies) and cultured in TCM199 medium (Sigma) supplemented with 10% new-born calf serum (Sigma) at 38℃ in 5% CO_2.

Cell culture

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were prepared from 12.5-day-old embryos from the OF1 strain (Charles River). Rabbit embryonic fibroblasts (REFs) were prepared from 12-day-old embryos from the New Zealand White (Hycole). Rabbit fibroblasts (rbFs) were prepared from the ear skin of a 5-month-old New Zealand White female. MEFs, REFs, rbFs, the 293T cell line (ATCC, CRL 11268), the rhesus monkey ESC (rhESC) line LyonES (Wianny et al., 2008), and mouse ESCs [mESCs, CGR8 line (Mountford et al., 1994)] were cultured as described elsewhere (Sandrin et al., 2002; Wianny et al., 2008; Savatier et al., 1996). EpiSCs were derived from epiblasts of 6.5-day-old mouse embryos of the OF1 strain and cultured as described previously (Brons et al., 2007). rbESCs and rbiPSCs were cultured on mitomycin C-treated MEFs (1.25×10^4 MEF/cm^2) in DMEM/F12 medium supplemented with 20% knockout serum replacement, 1% non-essential amino acids and 1% of a solution of 10,000 U/ml penicillin + 10,000 U/ml streptomycin + 29.2 mg/ml L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 100 µM 2-mercaptoethanol (Invitrogen). For rbESC and rbiPSCs culture, the medium was supplemented with 13 ng/ml or 10 ng/ml FGF2, respectively. rbiPSCs were routinely dissociated into single-cell suspensions after treatment with 0.05% trypsin–EDTA. rbESCs were dissociated into small clumps of cells after treatment with 1 mg/ml collagenase II (Sigma).

Immunosurgery

The mucin coat and the zona pellucida of rabbit blastocysts (70 to 72 h post-insemination; mid-blastocyst stage) were mechanically removed after brief exposure (2 min) to 5 mg/ml pronase (Sigma). ICMs were separated from the trophectoderm by immunosurgery after incubation of hatched blastocysts in anti-rabbit whole goat serum (Sigma) at 37℃ for 30 min and brief exposure (5 min) to guinea pig complement serum (Sigma). Isolated ICMs were transferred to four-well plates on mitomycin C-treated MEFs at a concentration of 3.5×10^4 cells/cm^2 in rbESC medium. After 5 to 6 days, the developing outgrowths were mechanically dissociated into small clumps and transferred onto fresh feeder cells at 2.5×10^4 cells/cm^2. All subsequent passages were performed by mechanical dissociation after treating colonies with collagenase II at 1 mg/ml, followed by plating cell clumps on feeder cells at a concentration of 1.25×10^4 cells/cm^2.

Virus production and cell infection

Plasmids used for producing retroviral and lentiviral vectors were either purchased from Addgene [pMXs-hOCT3/4 (17217), pMXs-hSOX2 (17218), pMXs-hKLF4

(17219), pMXs-hc-MYC (17220) (Takahashi et al., 2007) and pL-SIN-EOS-C(3+)-EiP (21313) (Hotta et al., 2009)] or obtained from Dr Cosset [pTG5349, phCMV-GP and pGAE-CAG-eGFP/wpre (Sandrin et al., 2002; Mangeot et al., 2002)] or Dr Suter [psPax2 and pMD2G (Suter et al., 2006)]. Virus production, concentration and titration were performed as previously described by transfection of 293T cells (Sandrin et al., 2002). Concentrated LacZ-expressing lentiviral particles were purchased from Allele Biotech (ABP-RP-TLCLACZL).

To generate rbiPSCs, 5×10^5 rbFs were infected twice at a two-day interval with 3×10^6 of viral particles, which contained equal parts of the four freshly produced hOct4, hSox2, hKlf4 and hMyc retroviruses [multiplicity of infection (m.o.i.)=8], in the presence of 4 μg/ml polybrene (Sigma). Three days after the second infection, rbFs were trypsinized into single cells and replated at low density (6×10^2 cells/cm^2) onto growth-inactivated MEFs in rbiPSC medium. The medium was changed every other day for 2 to 3 weeks until iPSC-like colonies appeared. To infect ESCs and iPSCs, the cells were plated on Matrigel (Beckton Dickinson) prior to infection with L-SIN-EOS-C(3+)-EiP and GAE-CAG-eGFP/wpre lentivectors at an m.o.i. of 5–10 in appropriate media supplemented with 6 μg/ml of polybrene. Rabbit eight-cell-stage embryos were infected by microinjection of 1 nl L-SIN-EOS-C(3+)-EiP and GAE-CAG-eGFP/wpre lentivectors (2×10^7 infectious particles/ml) under the mucous coat and zona pellucida.

Alkaline phosphatase and β-galactosidase detection, immunolabelling, flow cytometry and confocal microscopy analysis

Alkaline phosphatase and β-galactosidase activities were assessed using a PAL 86R-1KT kit (Sigma) and a GALS staining kit (Sigma), respectively, according to the manufacturer's instructions. To detect β-galactosidase activity in viable cells, LacZ-expressing cells were analysed by flow cytometry using a FluoReporter® lacZ flow cytometry kit (Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions.

For immunolabelling, the cells were grown on cover slips pre-treated with gelatin and FBS and coated with feeder cells. The cells were fixed with 2% paraformaldehyde (PFA; Sigma) in phosphate-buffered saline (PBS) at 4℃ for 30 min, permeabilized in Tris-buffered saline (TBS, 50 mM Tris pH 7.6, 0.9% NaCl, 0.2% Triton X-100) and washed three times (10 min each) in TBS. Non-specific binding sites were blocked with TBS supplemented with 10% FBS and 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h and subsequently incubated overnight at 4℃ with primary antibodies (supplementary material Table S1). After three rinses (10 min each) with TBS, the cells were incubated with fluorochrome-conjugated secondary antibodies (supplementary material Table S1) at room temperature (RT) for 1 h, followed by DNA staining with 0.5 μg/ml Hoechst 33342 for 3 min. Cover slips were mounted with mounting medium M1289 (Sigma), fixed with DPX medium (Cell Path), examined under a conventional fluorescence microscope (Leica DMRE) and analysed with Mercator software (Exploranova). For flow cytometry analysis, the cells were immunolabelled using the same protocols and the same antibodies used for immunostaining on coverslips, except that incubation with antibodies was at RT for 30 min. The cells were analysed using a FACS Canto II cytometer and FACSDiva software (Becton Dickinson). The same protocol was used to detect GFP expression in rabbit blastocysts by immunolabelling, except that embryos were fixed with 2% PFA and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in TBS. After DNA staining with 3 μg/ml of propidium iodide in 1% BSA, embryos were incubated sequentially in baths (30 min each) of 10%, 20% and 40% glycerol in TBS and then mounted on slides with mounting medium M1289 (Sigma) containing 0.1% p-phenylene-diamine (w/v) (Sigma). The embryos were observed by confocal microscopy (Leica TCS SP1 microscope with LSM software) at 488 nm and 555 nm (serial slices of 4 mm).

Real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from cell clumps, cell pellets and embryoid bodies (EBs) using an RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and reverse-transcribed using 200 U of M-MLV retrotranscriptase (Promega) and random primer mix (MWG). Real-time PCR used the StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems) and Fast SBYR® Green Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Following 40 amplification cycles, melt-curve analysis was used to verify that only the desired PCR products had been amplified. PCR efficiency for both target and reference genes was determined from the relative quantitative values for calibrator-normalized target gene expression using StepOnePlus Software V2.1 (Applied Biosystems). In all cases, expression of the target genes was normalized to those of rabbit TATA-box binding protein (*Tbp*) gene. But the same results were obtained with a normalization with the mRNA level of rabbit *Gapdh* gene. All primers used for RT-PCR and qPCR are shown in supplementary material Table S2.

Karyotype analysis

Chromosome spreads were prepared according to standard procedures and stained with Giemsa solution (Sigma). Thirty to fifty metaphase spreads were counted for each of the rbESC and rbiPSC lines. For karyotyping, G-banding was performed using 0.045% trypsin in Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free Tyrode (Sigma). For some rbESC and rbiPSC line analysed, 4 to 20 banded karyotypes were evaluated for chromosomal rearrangements.

EB formation and teratoma production

For EB formation, rbESCs and rbiPSCs were dissociated into single cells using 0.05% trypsin, resuspended in rbESC medium without FGF2 and cultured in hanging drops. For teratoma formation, $2–5\times10^6$ rbESCs or rbiPSCs were injected under the kidney capsules of 8-week-old severe combined immunodeficient (SCID) mice (CB17/SCID, Charles River). After 4–7 weeks, the mice were euthanized and lesions were surgically removed and fixed in 10% neutral buffered formalin (Curtin Matheson Scientific, Inc.) for paraffin sections, or in 4% PFA for cryosections.

Cell cycle analysis

Cells were cultured for 24 h with 50 ng/ml of doxorubicin hydrochloride (Adriamycin®, Sigma). Single-cell suspensions were fixed with 70% ethanol at −20℃, rehydrated with PBS at 4℃ for 30 min, rinsed twice with PBS and incubated with 0.1 mg/ml of RNAse A at RT for 30 min. Propidium iodide (30 mg/ml) was added to the cells for 1 min before analysis with a FACS Canto II cytometer (Becton Dickinson). Data were acquired using FACSDiva software (Becton Dickinson). The percentages of G1-, S- and G2-phase cells were determined using ModFitLT software (Verity Software House).

DNA methylation analysis

The methylation profile of the rabbit Oct4 promoter (GenBank: AC235550.2) was determined by bisulfite mutagenesis and sequencing as previously described (Borghol et al., 2008). Two regions of the Oct4 promoter were subjected to duplex-nested PCR. Region 1 is situated between positions −307 and +96 (25 CpG), and encompasses Conserved Region 1 (CR1) as defined by Kobolak et al. (Kobolak et al., 2009). Region 2 is situated between positions −2060 and −1626 (17 CpG sites), and encompasses Conserved Region 4 (CR4). Sequence of primers specific for bisulfite-converted DNA are as follows: Region 1, external forward: 5′-GTTTTTTTAGGGAGGGGGTAGAG-3′, external reverse: 5′-AAAACCTTAA-AAACTCAACCAAATCC-3′, internal forward: 5′-ATGGGGTGGAAGGGAT-TTTAG-3′, internal reverse: 5′-AAAATCCACCCAACCTAACTCC-3′; Region 2, external forward: 5′-GTTGGTTGGGTAGGAGTTTAT-3′, external reverse: 5′-TAACCCTATCAAACTTCTAAAAAACT-3′, internal forward: 5′-ATAAGTT-AAAGAGTTTTGTTTTTGG-3′, internal reverse: 5′-AACTTCTAAAAAACT AAATAACCTAACTCT-3′. The PCR products were cloned into the pNZY28-A plasmid (Nzyteh; Portugal) and 24 PCR-positive colonies were sequenced for each PCR product (Biofidal, Lyon, France).

Rabbit microarray and hybridization

A customized rabbit microarray was designed starting from the commercially available Agilent rabbit microarray (G2519F), and including genes expressed during preimplantation development in the rabbit (B.S.-P., L.J. and V.D., unpublished data). Briefly, rabbit embryonic ESTs obtained from four suppressive subtractive cDNA hybridizations (SSH) were included in the custom-made microarray. ESTs expressed during the first cleavage stages, blastocyst stage, and early gastrulation embryos were sequenced (Léandri et al., 2009), assembled into contigs and annotated through homology searches against nucleic and proteic databases. Furthermore, candidate genes sourced from Ensembl Genome Browser (oryCun2.0), and associated with pluripotency or embryonic development, were added to the design. The best quality probes from the commercially available Agilent transcriptome-wide rabbit microarray was added, resulting in a microarray with 62, 976 probes including positive and negative controls. The 60-mer oligosequence probes were designed by eArray (https://earray.chem.agilent.com/earray), and were used for microarrays synthesis *in situ* using the Agilent SurePrint™ technology (Agilent Technologies, Mississauga, On, Canada) with a 8×60 K format. The custom microarray design of the platform has been submitted to the NCBI GEO (Gene Expression Omnibus). The accession number of the platform is GSE43403.

For hybridization, cyanine-3 (Cy3) labeled cRNAs were prepared from 0.2 μg RNA using the One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions. Dye incorporation and cRNA yield were checked with the NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. 0.6 μg of Cy3-labelled cRNA (specific activity >6.0 pmol Cy3/ug cRNA) was fragmented at 60℃ for 30 minutes following the manufacturer's instructions. Hybridizations were performed for 17 hours at 65℃ in a rotating Agilent hybridization oven. After hybridization, microarrays were washed 1 minute at room temperature with GE Wash Buffer 1 (Agilent) and 1 minute with 37℃ GE Wash buffer 2 (Agilent), then dried immediately. Slides were scanned immediately after washing on the Agilent DNA Microarray Scanner using one color scan setting for 8×60k array slides (Scan Area 61×21.6 mm). The scanned images were analyzed with Feature Extraction Software (Agilent, 7.10.3.1). Features flagged in Feature Extraction as Feature Non-uniform outliers were excluded. Normalization procedures were performed using R

statistical software (R: A language and environment for statistical computing (R Foundation for Statistical Computing), Vienna, Austria; 2012, R-Core-Team; http://www.r-project.org) and data were normalized using intra-array median substraction and log2 transformation.

Statistical analysis

Principal component analysis (PCA) was performed on qRT-PCR data (centered and reduced) using R statistical software (FactoMineR: Multivariate exploratory: data analysis and data mining with R; R package version 1.20, 2012, Husson et al.; http://cran.r-project.org/web/packages/FactoMineR/index.html). Other statistical analyses were done using the test of Kruskal–Wallis. Normalized transcriptome data were analyzed by hierarchical clustering using the Pearson correlation coefficient as a measure of distance.

Injection of cells into pre-implantation embryos and aggregation with morulas

For microinjection, ESCs and iPSCs were dissociated into single-cell suspensions. Five to 10 cells were microinjected under the mucous coat and zona pellucida of eight-cell-stage rabbit embryos. The embryos injected with GFP-expressing cells were cultured *in vitro* until they reached the mid-blastocyst stage, fixed in 2% PFA and immunostained with anti-GFP antibody.

For morula aggregation, fertilized eggs were harvested 20 hours after insemination, and cultured in RDH medium (Invitrogen), as described elsewhere (Jin et al., 2000). When they reached the eight-cell stage, embryos were treated with pronase to eliminate the zona pellucida and placed with clumps of 20–25 PSCs in microwells to induce aggregations, as described previously (Wood et al., 1993). Successful aggregates were cultured for 48 hours until they reached the blastocyst stage and subsequently analysed for β-galactosidase activity.

Acknowledgements

We thank Nicolas Gadot and Jean-Yves Scoazec (ANIPATH, SFR Santé Lyon-Est, Lyon, France) for teratoma histology, Thibault Andrieu and Sébastien Dussurgey (SFR BioSciences Gerland–Lyon Sud) for technical assistance with flow cytometry and cell sorting, the INRA SIGENAE team (http://www.sigenae.org) for their help in designing the customized rabbit array, and Jérome Lecardonnel for technical assistance in array hybridization. This work was supported by research grants from “Agence Nationale de la Recherche” (ANR) (project PLURABBIT no. PCS-09-GEM-08), European Cooperation in Science and Technology (COST) Action (Rabbit Genome Biology (RGB)-Net no. TD1101), the HyPharm Company (PhD Grant INRA/HyPharm no. 04012010) and the “région Rhône-Alpes” (ADR CIBLE 2010 project no. R10065CC). This work was performed within the framework of (i) the LABEX DEVWECAN (ANR-10-LABX-0061) and the LABEX CORTEX (ANR-11-LABX-0042) of Université de Lyon (“Investissements d’Avenir” no. ANR-11-IDEX-0007), (ii) the Institute CESAME (“Investissements d’Avenir” no. ANR-10-IBHU-003) and (iii) the “Infrastructure Nationale en Biologie et Santé” INGESTEM (“Investissements d’Avenir” no. ANR-11-INBS-0009), operated by the ANR.

Competing Interests

The authors have no competing interests to declare.

References

Al-Gubory, K. H. and Houdebine, L. M. (2006). *In vivo* imaging of green fluorescent protein-expressing cells in transgenic animals using fibred confocal fluorescence microscopy. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 837-845.

Aladjem, M. I., Spike, B. T., Rodewald, L. W., Hope, T. J., Klemm, M., Jaenisch, R. and Wahl, G. M. (1998). ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr. Biol.* **8**, 145-155.

Bao, S., Tang, F., Li, X., Hayashi, K., Gillich, A., Lao, K. and Surani, M. A. (2009). Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* **461**, 1292-1295.

Borghol, N., Blachère, T. and Lefèvre, A. (2008). Transcriptional and epigenetic status of protamine 1 and 2 genes following round spermatids injection into mouse oocytes. *Genomics* **91**, 415-422.

Brons, I. G., Smithers, L. E., Trotter, M. W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Howlett, S. K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. A. et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**, 191-195.

Burdon, T., Smith, A. and Savatier, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* **12**, 432-438.

Chang, K. H. and Li, M. (2013). Clonal isolation of an intermediate pluripotent stem cell state. *Stem Cells*.

Coronado, D., Godet, M., Bourillot, P. Y., Tapponnier, Y., Bernat, A., Petit, M., Afanassieff, M., Markossian, S., Malashicheva, A., Iacone, R. et al. (2013). A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Res.* **10**, 118-131.

Fang, Z. F., Gai, H., Huang, Y. Z., Li, S. G., Chen, X. J., Shi, J. J., Wu, L., Liu, A., Xu, P. and Sheng, H. Z. (2006). Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos. *Exp. Cell Res.* **312**, 3669-3682.

Filipczyk, A. A., Laslett, A. L., Mummery, C. and Pera, M. F. (2007). Differentiation is coupled to changes in the cell cycle regulatory apparatus of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* **1**, 45-60.

Fluckiger, A. C., Marcy, G., Marchand, M., Négre, D., Cosset, F. L., Mitalipov, S., Wolf, D., Savatier, P. and Dehay, C. (2006). Cell cycle features of primate embryonic stem cells. *Stem Cells* **24**, 547-556.

Hanna, J., Cheng, A. W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C. J., Soldner, F., Cassady, J. P., Muffat, J., Carey, B. W. and Jaenisch, R. (2010). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 9222-9227.

Hawkins, K., Mohamet, L., Ritson, S., Merry, C. L. and Ward, C. M. (2012). E-cadherin and, in its absence, N-cadherin promotes Nanog expression in mouse embryonic stem cells via STAT3 phosphorylation. *Stem Cells* **30**, 1842-1851.

Honda, A., Hirose, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Shimozawa, N., Hatori, M., Shimizu, N., Murata, T., Hirose, M. et al. (2008). Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. *Reprod. Biomed. Online* **17**, 706-715.

Honda, A., Hirose, M. and Ogura, A. (2009). Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.* **315**, 2033-2042.

Honda, A., Hirose, M., Hatori, M., Matoba, S., Miyoshi, H., Inoue, K. and Ogura, A. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *J. Biol. Chem.* **285**, 31362-31369.

Hong, Y. and Stambrook, P. J. (2004). Restoration of an absent G1 arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14443-14448.

Hotta, A., Cheung, A. Y., Farra, N., Vijayaragavan, K., Séguin, C. A., Draper, J. S., Pasceri, P., Maksakova, I. A., Mager, D. L., Rossant, J. et al. (2009). Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nat. Methods* **6**, 370-376.

Jin, D. I., Kim, D. K., Im, K. S. and Choi, W. S. (2000). Successful pregnancy after transfer of rabbit blastocysts grown *in vitro* from single-cell zygotes. *Theriogenology* **54**, 1109-1116.

Kobolak, J., Kiss, K., Polgar, Z., Mamo, S., Rogel-Gaillard, C., Tancos, Z., Bock, I., Baji, A. G., Tar, K., Pirity, M. K. et al. (2009). Promoter analysis of the rabbit POU5F1 gene and its expression in preimplantation stage embryos. *BMC Mol. Biol.* **10**, 88.

Léandri, R. D., Archilla, C., Bui, L. C., Peynot, N., Liu, Z., Cabau, C., Chastellier, A., Renard, J. P. and Duranthon, V. (2009). Revealing the dynamics of gene expression during embryonic genome activation and first differentiation in the rabbit embryo with a dedicated array screening. *Physiol. Genomics* **36**, 98-113.

Mangeot, P. E., Duperrier, K., Nègre, D., Boson, B., Rigal, D., Cosset, F. L. and Darlix, J. L. (2002). High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors. *Mol. Ther.* **5**, 283-290.

Momcilovic, O., Knobloch, L., Fornsaglio, J., Varum, S., Easley, C. and Schatten, G. (2010). DNA damage responses in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *PLoS ONE* **5**, e13410.

Mountford, P., Zevnik, B., Düwel, A., Nichols, J., Li, M., Dani, C., Robertson, M., Chambers, I. and Smith, A. (1994). Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4303-4307.

Mummery, C. L., van den Brink, C. E. and de Laat, S. W. (1987). Commitment to differentiation induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells is cell cycle dependent. *Dev. Biol.* **121**, 10-19.

Murakami, H. and Imai, H. (1996). Successful implantation of *in vitro* cultured rabbit embryos after uterine transfer: a role for mucin. *Mol. Reprod. Dev.* **43**, 167-170.

Nichols, J. and Smith, A. (2009). Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* **4**, 487-492.

Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H. and Ishikawa, F. (2005). Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 5307-5317.

Salvetti, P., Buff, S., Afanassieff, M., Daniel, N., Guérin, P. and Joly, T. (2010). Structural, metabolic and developmental evaluation of ovulated rabbit oocytes before and after cryopreservation by vitrification and slow freezing. *Theriogenology* **74**, 847-855.

Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Nègre, D., Le Grand, R., Trono, D. and Cosset, F. L. (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* **100**, 823-832.

Savatier, P., Lapillonne, H., van Grunsven, L. A., Rudkin, B. B. and Samarut, J. (1996). Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor

up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* **12**, 309-322.

Sela, Y., Molotski, N., Golan, S., Itskovitz-Eldor, J. and Soen, Y. (2012). Human embryonic stem cells exhibit increased propensity to differentiate during the G1 phase prior to phosphorylation of retinoblastoma protein. *Stem Cells* **30**, 1097-1108.

Suter, D. M., Cartier, L., Bettiol, E., Tirefort, D., Jaconi, M. E., Dubois-Dauphin, M. and Krause, K. H. (2006). Rapid generation of stable transgenic embryonic stem cell lines using modular lentivectors. *Stem Cells* **24**, 615-623.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872.

Tang, F., Barbacioru, C., Bao, S., Lee, C., Nordman, E., Wang, X., Lao, K. and Surani, M. A. (2010). Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. *Cell Stem Cell* **6**, 468-478.

Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., Gardner, R. L. and McKay, R. D. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196-199.

Wang, S., Tang, X., Niu, Y., Chen, H., Li, B., Li, T., Zhang, X., Hu, Z., Zhou, Q. and Ji, W. (2007). Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells* **25**, 481-489.

Wang, S., Shen, Y., Yuan, X., Chen, K., Guo, X., Chen, Y., Niu, Y., Li, J., Xu, R. H., Yan, X. et al. (2008). Dissecting signaling pathways that govern self-renewal of rabbit embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 35929-35940.

Wang, L., Xue, Y., Shen, Y., Li, W., Cheng, Y., Yan, X., Shi, W., Wang, J., Gong, Z., Yang, G. et al. (2012). Claudin 6: a novel surface marker for characterizing mouse pluripotent stem cells. *Cell Res.* **22**, 1082-1085.

Wianny, F., Bernat, A., Huissoud, C., Marcy, G., Markossian, S., Cortay, V., Giroud, P., Leviel, V., Kennedy, H., Savatier, P. et al. (2008). Derivation and cloning of a novel rhesus embryonic stem cell line stably expressing tau-green fluorescent protein. *Stem Cells* **26**, 1444-1453.

Wood, S. A., Allen, N. D., Rossant, J., Auerbach, A. and Nagy, A. (1993). Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras. *Nature* **365**, 87-89.

Yeom, Y. I., Fuhrmann, G., Ovitt, C. E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hübner, K. and Schöler, H. R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* **122**, 881-894.

Supplementary Material
Pierre Osteil et al. doi: 10.1242/bio.20134242

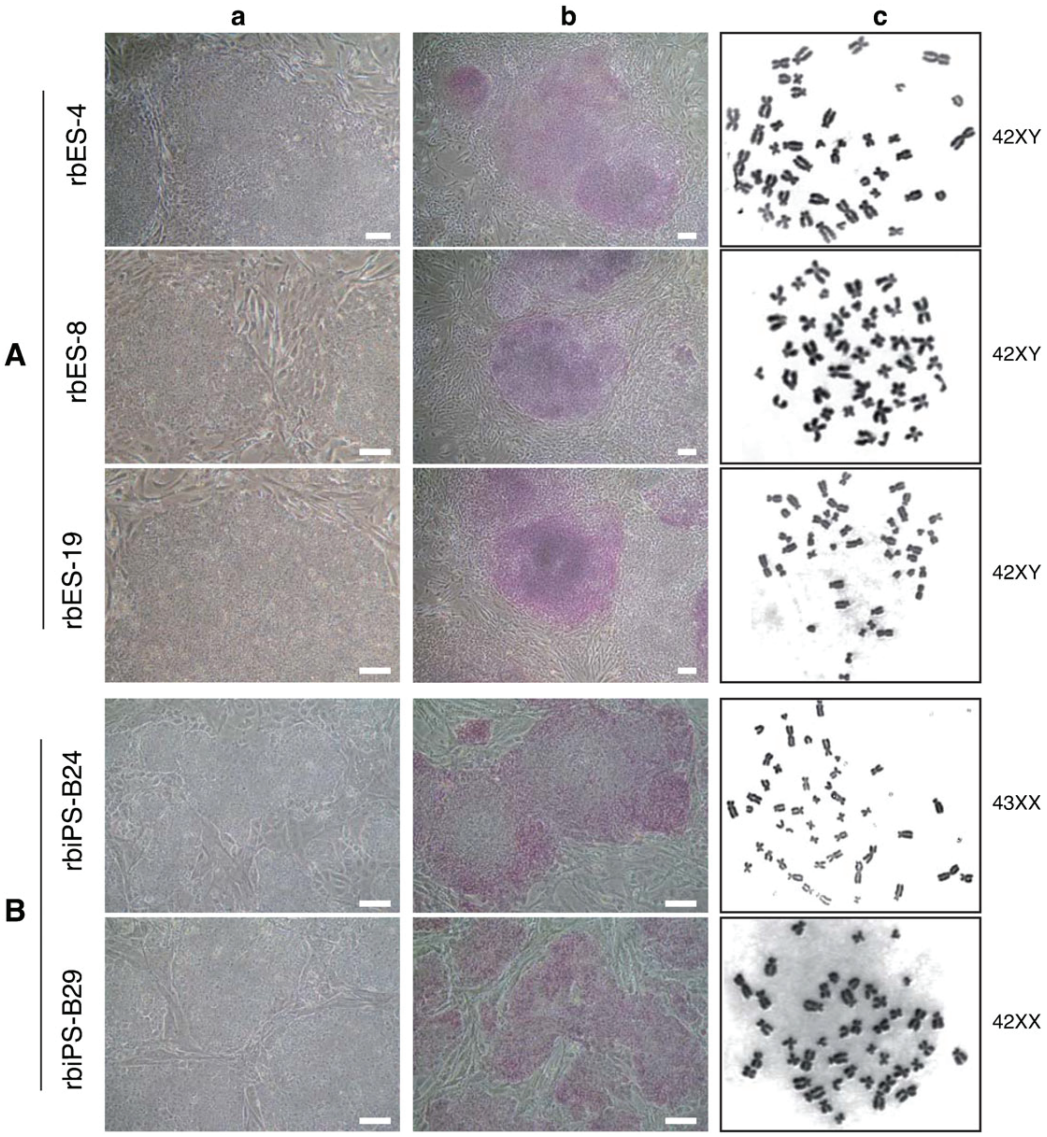


Fig. S1. Alkaline phosphatase activity and metaphase spreads in rabbit PSC lines. (**A**) rbESC lines. (**B**) rbiPSC lines. (**a**) Phase-contrast images. (**b**) Alkaline phosphatase activity. (**c**) Spreads of metaphase chromosomes at P13 (rbES-4), P17 (rbES-8), P21 (rbES-19), P33 (rbiPS-B24), and P31 (rbiPS-B29) (P=passage). Scale bars: 50 µm.

Biology Open

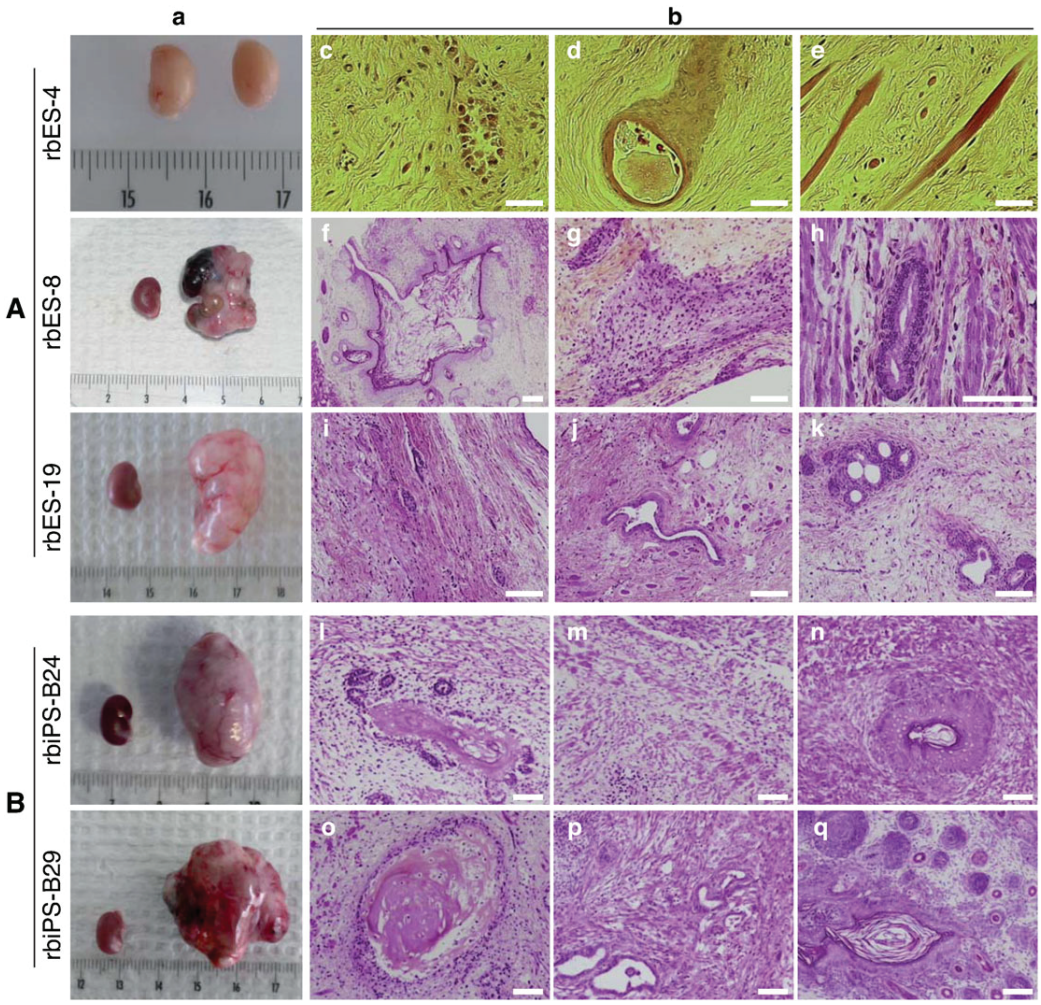


Fig. S2. Teratoma formation using rabbit PSC lines. (**A**) rbESC lines. (**B**) rbiPSC lines. (**a**) Images of teratomas 28–50 days after injecting 2–5×10^6 cells under the kidney capsule of SCID mice (note: for rbES-4 cells, teratomas were evaluated after 140 days after injecting 0.5–1×10^6 cells into each testis of SCID mice). (**b**) Staining of teratoma sections with HPS, which shows skin structures (**f**), neuronal cells (**g**,**i**), gland structures (**c**,**h**,**i**,**k**,**l**,**p**), muscle cells (**e**,**j**,**k**,**m**,**n**,**p**), squamous epithelia cells (**j**,**n**,**q**), and cartilage and bone structures (**d**,**o**). Scale bars: 50 µm.

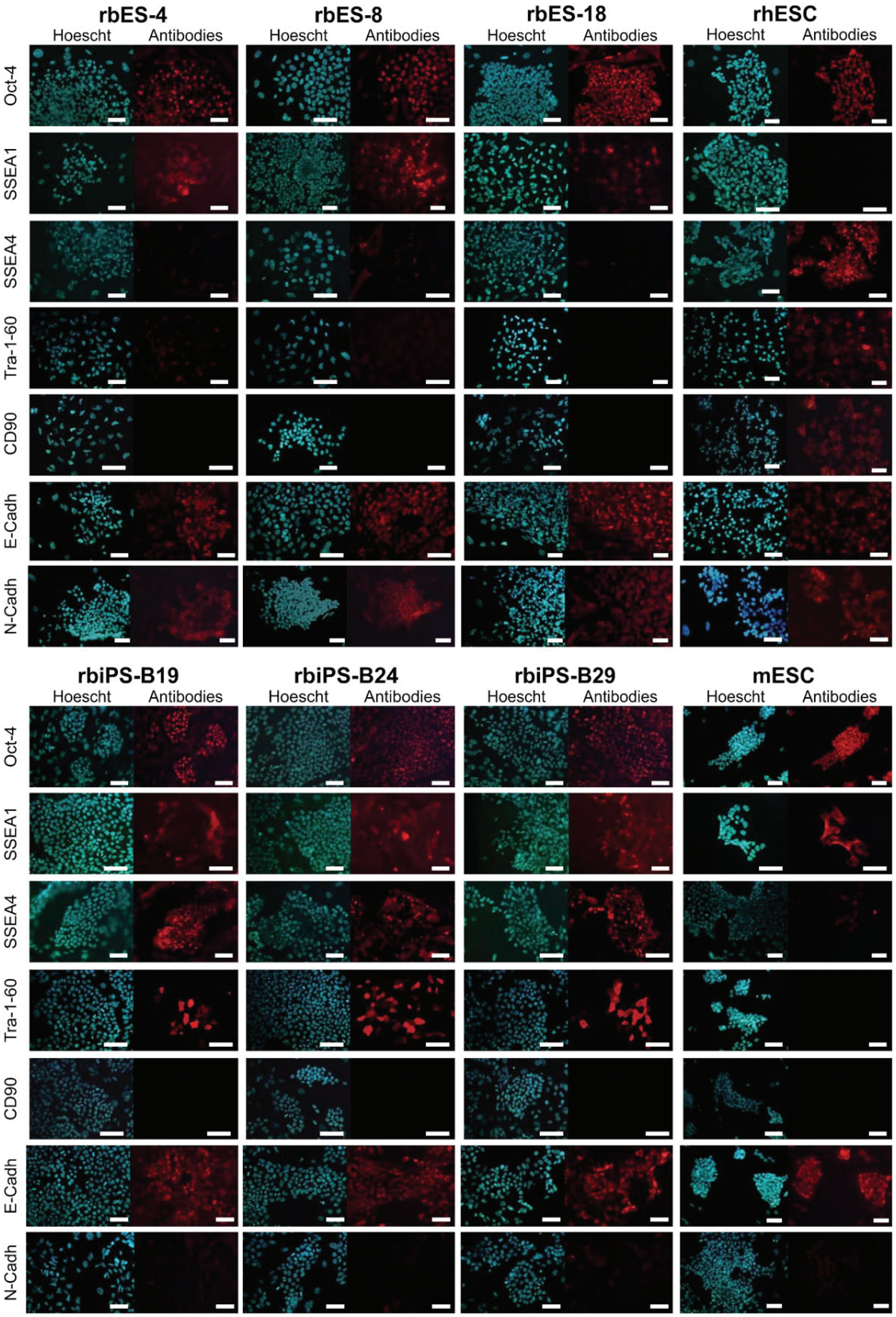


Fig. S3. Expression of pluripotency and cell-surface markers by rabbit PSC lines. Immunolabeling of Oct4, SSEA1, SSEA4, Tra-1-60, CD90, E-cadherin and N-cadherin. Scale bars: 50 μm.

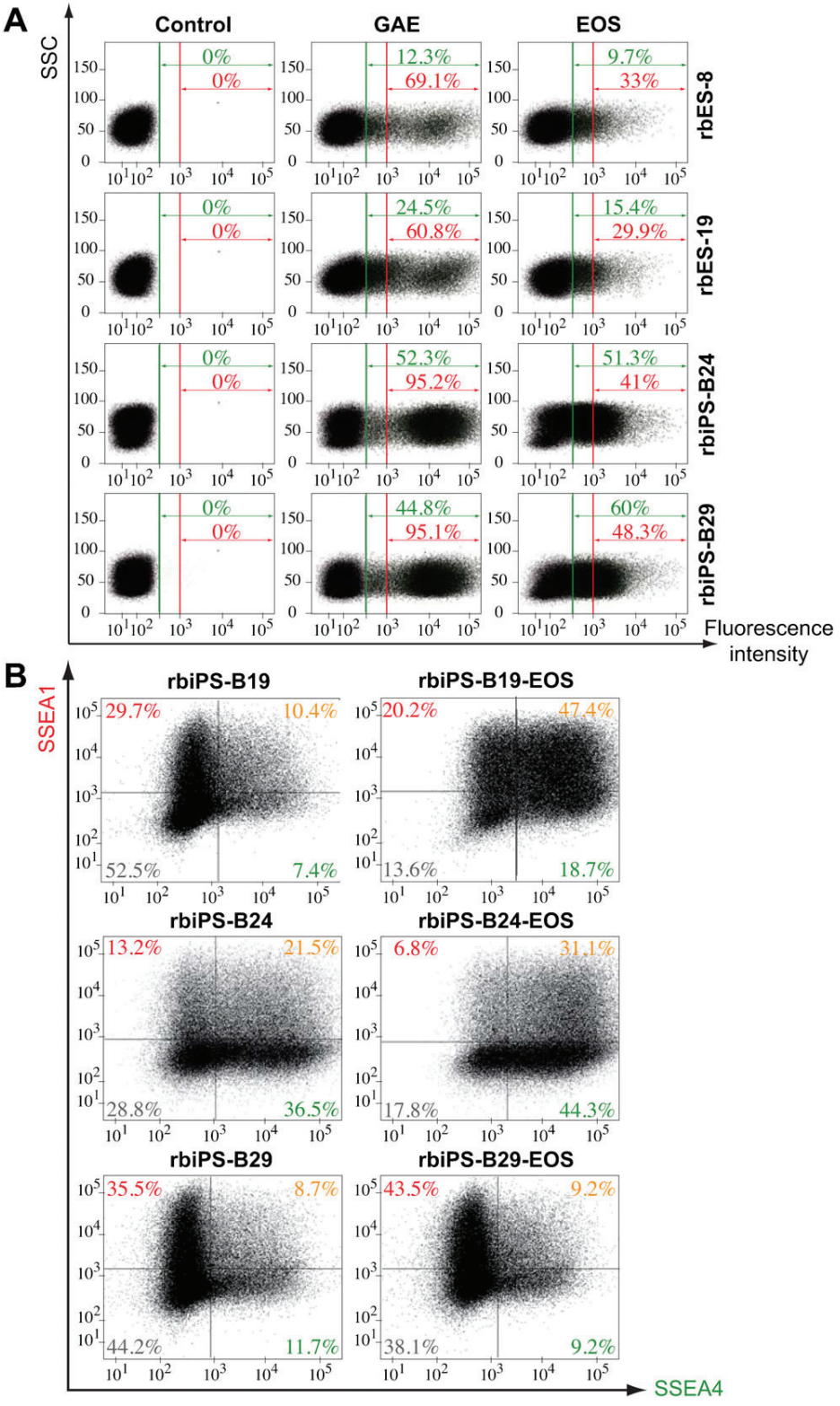


Fig. S4. Mouse Oct4 promoter activities and expressions of cell-surface markers in rabbit PSC lines. (**A**) Flow cytometry analysis of rbES-8, rbES-19, rbiPS-B24, and rbES-B29 4 days after infection with the GAE and EOS lentivectors. For each dot plot, the numbers in green indicate the percentages of all GFP^+ cells. Numbers in red indicate the percentages of GFP^+ cells that had a fluorescence level of $\geq 10^3$, normalized to the percentage of all GFP^+ cells. (**B**) Flow cytometry analysis of SSEA1 and SSEA4 marker expression by rbiPS-B19-EOS, rbiPS-B24-EOS, and rbiPS-B29-EOS lines before (left panels) and after (right panels) puromycin selection. Of note, immunolabeling and flow cytometry analysis were performed after cell fixation to eliminate GFP fluorescence resulting from EOS lentivector expression.

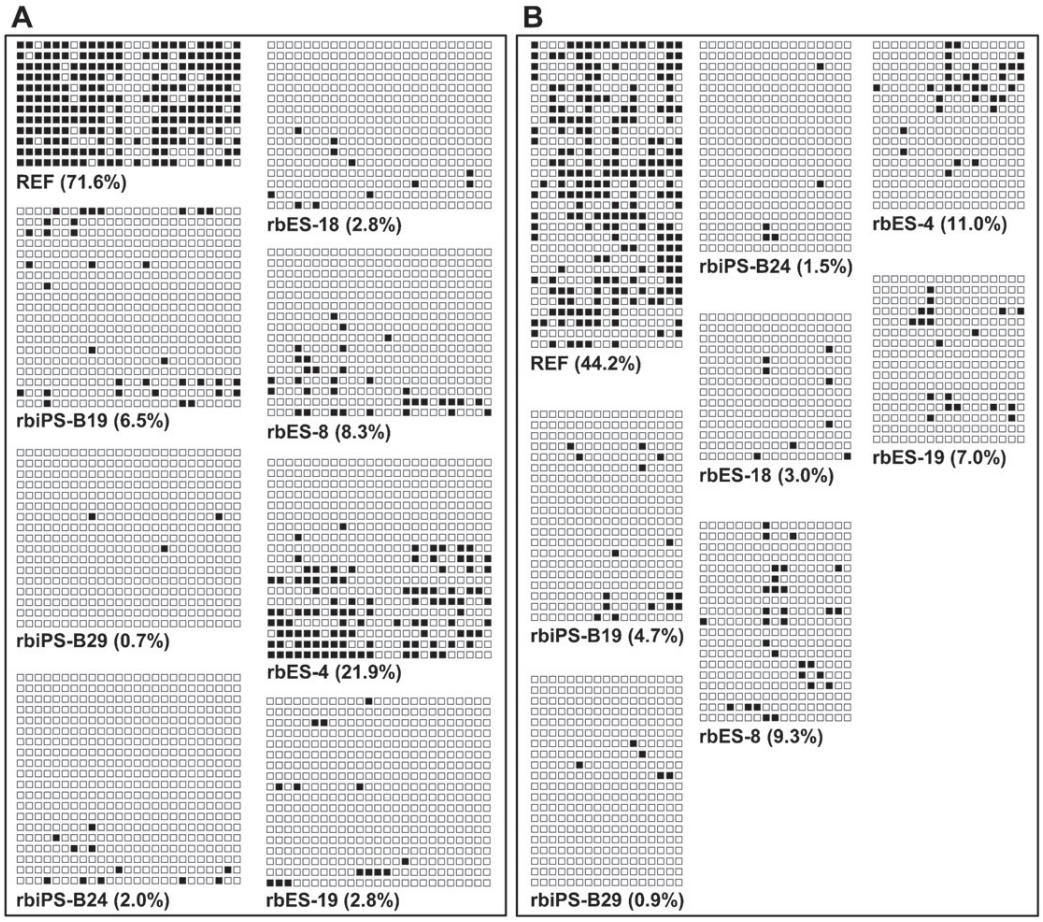


Fig. S5. Bisulfite genomic sequencing of the CR1 and CR4 promoter regions of Oct4 in rbESCs, rbiPSCs, and rabbit embryonic fibroblasts (REF). (**A**) CR1 promoter region. (**B**) CR4 promoter region. Open circles indicate unmethylated CpG dinucleotides while closed circles indicate methylated CpGs.

Biology Open

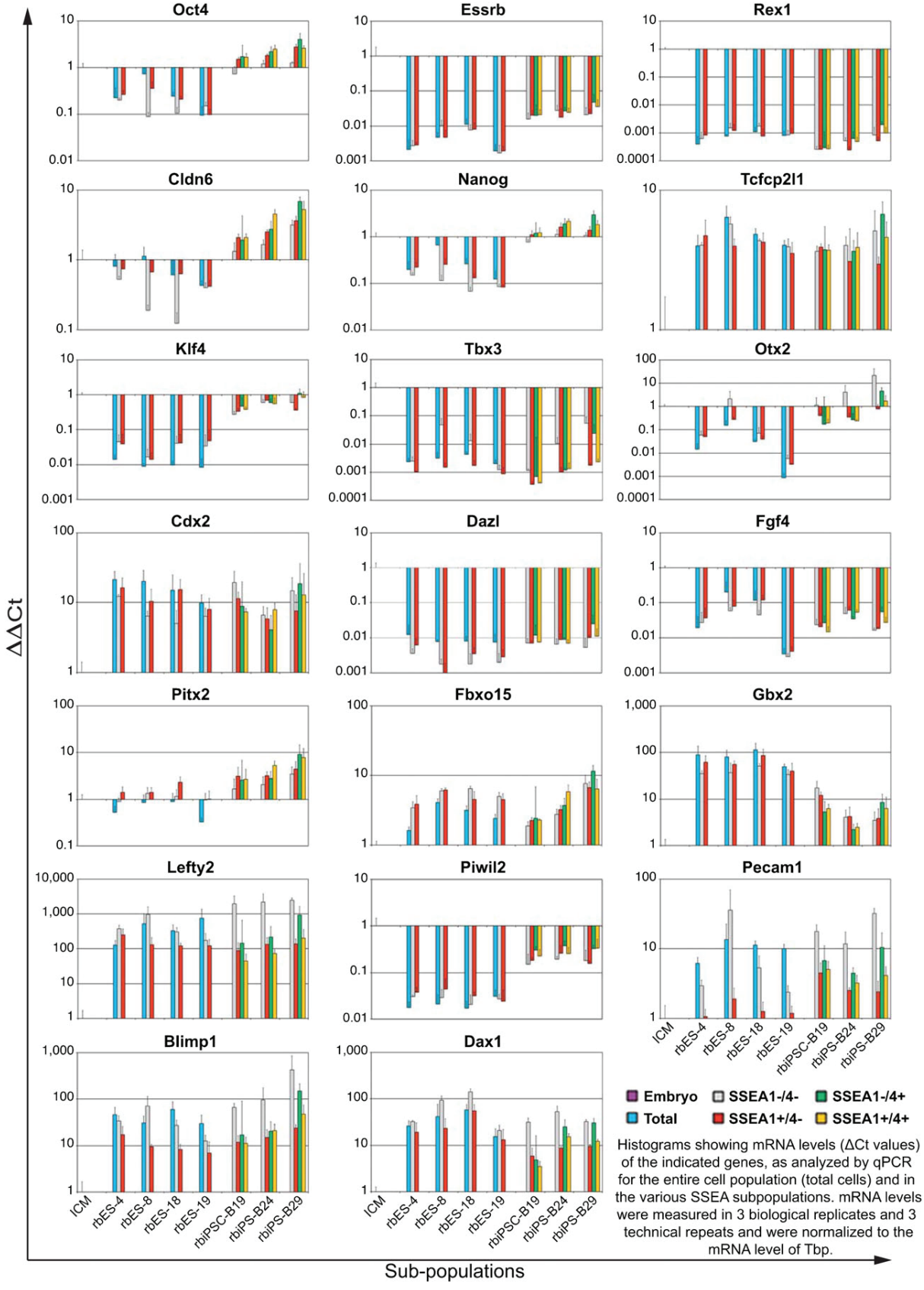


Fig. S6. Expression of pluripotency markers by rbESC and rbiPSC lines.

Table S1. List of antibodies.

Molecule	Antibodies	Dilution	Manufacturer	Reference	Method
GFP	AF488[a] Anti-GFP Rabbit IgG	1/1000	Invitrogen	A21311	IF[c]
OCT-4	1°: Anti-Oct-4 Rabbit IgG	1/300	Santa Cruz	SC-9081	IF
	2°: AF555[b] Goat Anti-Rabbit IgG	1/1000	Invitrogen	A21429	
SSEA1	PE Anti-SSEA1 Mouse IgM	1/50	R&D Systems	FAB2155P	IF
	AF647 Anti-SSEA1 Mouse IgM	1/100	Santa Cruz	SC-21702	FC[d]
SSEA4	1°: Anti-SSEA4 Mouse IgG	1/100	Millipore	MAB4304	IF
	2°: AF555 Goat Anti-Mouse IgG	1/100	Invitrogen	A21422	
	1°: Anti-SSEA4 Mouse IgG	1/200	Santa Cruz	SC-21704	FC
	2°: AF488 Goat anti-Mouse IgG	1/1000	Invitrogen	A11017	
Tra-1-60	1°: Anti-Tra-1-60 Mouse IgM	1/50	Millipore	MAB4360	IF
	2°: AF555 Goat Anti-Mouse IgM	1/500	Invitrogen	A21426	
E-Cadh	PE Anti-E-Cadherin Rat IgG2A	1/50	R&D Systems	FAB7481P	IF
N-Cadh	1°: Anti-N-Cadherin Rabbit IgG	1/200	Santa Cruz	SC-7939	IF
	2°: Rhodamine Goat anti-Rabbit IgG	1/1000	Molecular Probes	RG314	
Desmin	1°: Anti-Desmin Mouse IgG1	1/50	DakoCytomation	M0760	IF
	2°: AF555 Goat Anti-Mouse IgG	1/800	Invitrogen	A21422	
GFAP	1°: Anti-GFAP Rabbit IgG	1/1000	DakoCytomation	Z0334	IF
	2°: AF555 Goat Anti-Rabbit IgG	1/800	Invitrogen	A21429	
Glucagon	1°: Anti-Glucagon Mouse IgG1	1/500	Sigma	G2654	IF
	2°: AF555 Goat Anti-Mouse IgG	1/800	Invitrogen	A21422	
CD90	1°: Anti-CD90 Mouse IGG	1/50	PharmingenTM	550402	IF
	2°: AF555 Goat Anti-Mouse IgM	1/500	Invitrogen	A21426	

[a]AlexaFluor 488;
[b]AlexaFluor 555;
[c]Immunostaining;
[d]Flow cytometry.

Table S2. List of primers used for RT-PCR and Q-PCR analysis.

Gene	Origin	Primers	Annealing temperature	Method
Tbp	Rabbit	Forward: CTTGGCTCCTGTGCACACCATT Reverse: ATCCCAAGCGGTTTGCTGCTGT	60℃	qPCR
Gadph	Rabbit	Forward: GAGCTGAACGGGAAACTCAC Reverse: CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT	56℃	RT-PCR
Gadph	Rabbit	Forward: TTCCACGGCACGGTCAAGGC Reverse: GGGCACCAGCATCACCCCAC	60℃	qPCR
Nanog	Rabbit	Forward: CCTCAGCCTTCAGCAGATGCAAGAACTC Reverse: GGCAGTGGTGTAGGCAGCCCC	58℃	RT-PCR
Nanog	Rabbit	Forward: CACTGATGCCCGTGGTGCCC Reverse: AGCGGAGAGGCGGTGTCTGT	60℃	qPCR
Oct4	Rabbit	Forward: GCAGATCAGCCACATCGCCCAGC Reverse: GCGTCTCCCCTGACCTCTGCCTC	60℃	RT-PCR
Oct4	Rabbit	Forward: CCTGCTCTGGGCTCCCCCAT Reverse: TGACCTCTGCCTCCACCCCG	60℃	qPCR
OCT4	Human	Forward: CAGGGCCCCATTTTGGTACC Reverse: TTATCGTCGACCACTGTGCTGGCG	60℃	RT-PCR
SOX2	Human	Forward: CCTCCGGGACATGATCAGC Reverse: TTATCGTCGACCACTGTGCTGGCG	60℃	RT-PCR
KLF4	Human	Forward: TTCGCCCGCTCAGATGAACTG Reverse: TTATCGTCGACCACTGTGCTGGCG	60℃	RT-PCR
Klf4	Rabbit	Forward: TCCGGCAGGTGCCCCGAATA Reverse: CTCCGCCGCTCTCCAGGTCT	60℃	qPCR
C-MYC	Human	Forward: CAGCATACATCCTGTCCGTCC Reverse: TTATCGTCGACCACTGTGCTGGCG	60℃	RT-PCR
Dazl	Rabbit	Forward: CACAGTGGCCTACTGGGGAACA Reverse:TTCGGCGCCTGGGTCAACTT	60℃	qPCR
Hnf3β	Rabbit	Forward: GTACGCCAACATGAACTCCA Reverse: GAGGAAGCAGTCGTTGAAGG	55℃	RT-PCR
Tbx3	Rabbit	Forward: TGGATTCGGGCTCGGAACTGA Reverse: AGCCGCTGGATGCTCTGAAGT	60℃	qPCR
Blimp1	Rabbit	Forward: AGCGGCGAACGGCCTTTCAAAT Reverse: GACCTGGCATTCATGCGGCTTT	60℃	qPCR
Lefty2	Rabbit	Forward: ACTGCCGCATTGCCCATGAT Reverse: AGCTGCACTGCTTCACCCTCAT	60℃	qPCR
Dax1	Rabbit	Forward: GCCTGCAGTGCGTGAAGTACA Reverse: CGGTGCGTCATCCTGACGTG	60℃	qPCR
Nestin	Rabbit	Forward: AGAATTCCCGGCTTCAGACA Reverse: TCTTCAGAAAGGCTGGCACA	55℃	RT-PCR
Fbxo15	Rabbit	Forward: AGGCTCGGCCACTGTTCCTT Reverse: CACGTGGAGCTGGTAGCCATGT	60℃	qPCR
Flk1	Rabbit	Forward: GTATATCTGTGCGGCGTCCA Reverse: ATGGGGTTGGTGAGGATGAC	59℃	RT-PCR
Pecam1	Rabbit	Forward: AGAGGAGCTGGAGCAGGTGTTAAT Reverse: GCTGATGTGGAACTTCGGAACAGA	60℃	qPCR
Piwil2	Rabbit	Forward: TGACCTTTCCGGATCCTTCAGTGT Reverse: TCCGAACTCCCTCTTCCAAGCATT	60℃	qPCR
Gbx2	Rabbit	Forward: AACGCGTGAAGGCGGGCAAT Reverse: TGCTGGTGCTGGCTCCGAAT	60℃	qPCR
Rex1	Rabbit	Forward: AGCCCAGCAGGCAGAAATGGAA Reverse: TGGTCAGTCTCACAGGGCACAT	60℃	qPCR
Fgf4	Rabbit	Forward: ACGCAGACACGAGCGACAGC Reverse: CGGCTGGCCACGCCAAAGAT	60℃	qPCR
Otx2	Rabbit	Forward: TCCGGCTCGGGAAGTGAGTT Reverse: GGAGCACTGCTGCTCGCAAT	60℃	qPCR
Cldn6	Rabbit	Forward: GCAGCCTCGGGCCTTTTGTTG Reverse: TCGGGCCAGACGCTGAGTAG	60℃	qPCR
Pitx2	Rabbit	Forward: ACTAGCGCGCAGCTCAAGGA Reverse:CAGCTCCTCGCGCGTGTAAA	60℃	qPCR
Cdx2	Rabbit	Forward: CTCAACCTGGCGCCGCAGAA Reverse: GCGCGCTGTCCAAGTTCGC	60℃	qPCR
Cdh1	Rabbit	Forward: TGCACAGGCCGGAAACCAGT Reverse: ACGGCCTTCAGCGTGACCTT	60℃	qPCR
Cdh2	Rabbit	Forward: CCGTGGCAGCTGGACTGGAT Reverse: GATGACGGCCGTGGCTGTGT	60℃	qPCR
Essrb	Rabbit	Forward: CGTGGAGGCCGCCAGAAGTA Reverse: TCTGGCTCGGCCACCAAGAG	60℃	qPCR
Tcfcp2	Rabbit	Forward: AGAAAAGGGCGTGCCGTTCC Reverse: TGGCAGCTGGCTGAGTGCAA	60℃	qPCR

Table S3. Percentages of pluripotent stem cells in G1-, S-, and G2/M phases.

Pluripotent stem cells	Lines	Cell-cycle phases	Percentages of cells in G1-, S-, and G2/M phases				
			Whole cell populations	$SSEA1^+$ $SSEA4^-$ cells	$SSEA1^+$ $SSEA4^+$ cells	$SSEA1^-SSEA4^+$ cells	$SSEA1^-$ $SSEA4^-$ cells
Control-	rbF	G1	80.6	–	–	–	–
		S	6.7				
		G2/M	12.7				
mESCs	CGR8	G1	20.7	16.6	–	–	28.0
		S	68.3	71.3			63.8
		G2/M	11.0	12.1			8.2
mEpiSCs	–	G1	28.5	–	–	–	–
		S	56.6				
		G2/M	14.9				
rhESCs	LyonES	G1	41.3	–	–	41.1	40.4
		S	41.4			40.7	40.5
		G2/M	17.3			18.2	19.1
rbESCs	rbES-4	G1	70.6	57.0	–	–	75.3
		S	19.2	35.0			16.7
		G2/M	10.2	8.0			8.0
	rbES-8	G1	76.8	65.9	–	–	78.2
		S	15.3	22.1			14.6
		G2/M	7.9	12.0			7.2
	rbES-18	G1	76.9	56.6	–	–	80.4
		S	20.2	27.2			19.3
		G2/M	2.9	16.2			0.3
	rbES-19	G1	72.7	55.5	–	–	75.0
		S	23.0	28.0			21.5
		G2/M	4.3	16.5			3.5
rbiPSCs	rbiPS-B19	G1	40.8	36.0	30.8	42.9	45.8
		S	39.4	39.6	40.9	39.1	38.1
		G2/M	19.8	24.4	28.3	18.0	16.1
	rbiPS-B24	G1	46.5	41.4	35.5	39.8	49.0
		S	33.8	32.4	26.4	38.1	33.8
		G2/M	19.7	26.2	38.1	22.1	17.2
	rbiPS-B29	G1	42.2	39.0	33.9	32.8	49.6
		S	42.1	45.9	37.6	51.9	39.0
		G2/M	15.7	15.1	28.5	15.2	11.4

Table S5. Colonization of rabbit pre-implantation embryos by rbESCs, mESCs, and rbiPSCs.

Technique	Marker gene	Line	Number of embryos	Number of blasto-cysts (percentage)	Number of positive embryos (percentage)
Microinjection of 5–10 cells into 8-cell stage embryos	GFP	rbES-18	20	16 (80%)	0
		rbES-18 $SSEA1^+$	67	58 (87%)	0
		mESC CGR8-GFP	15	15 (100%)	15 (100%)
		rbiPS-B19-GFP	47	47 (100%)	1 (2.1%)
		rbiPS-B19-GFP $SSEA1^+$	65	64 (98%)	1 (1.5%)
Aggregation between clumps of 20–25 cells and 8-cell stage embryos	LacZ	rbiPS-B19-LacZ-EOS	114	62 (54%)	10 (16.1%)

Table S4. Ct of qPCR data.

	Line	Sub-populations	Biological replicates	Technical replicates	Reference gene		Genes																				
					GAPDH	TBP	OCT4	NANOG	REX1	DAX1	BLIMP1	KLF4	TBX3	CLDN6	CDX2	OTX2	PITX2	PECAM1	PIWIL2	DAZL	FBX015	GBX2	FGF4	LEFTY2	ESRRB	TCFcp2	CDH1	CDH2
RbESC	4	TOTAL	1	1	16,918	24,087	21,371	25,035	34,722	28,467	27,154	27,874	31,881	21,560	22,814	34,213	31,012	28,750	36,439	32,458	28,933	22,455	32,515	23,991	33,946	22,727	26,321	21,265
				2	16,934	24,310	20,947	24,384	33,967	27,764	26,981	27,427	31,495	21,073	22,295	32,034	30,190	28,459	36,115	30,561	28,336	22,014	32,142	23,725	32,980	22,403	25,916	21,178
				3	16,990	24,428	20,878	24,589	34,663	27,950	27,064	27,311	31,383	21,115	22,461	31,665	30,610	28,745	35,435	30,836	28,717	21,977	31,922	23,841	35,727	22,642	26,064	21,247
			2	1	16,934	24,075	23,099	25,988	33,641	28,893	26,326	28,410	31,219	21,698	22,880	30,474	31,098	28,439	36,767	33,613	28,489	23,252	34,234	24,063	30,787	23,021	26,984	20,862
				2	16,980	23,942	22,568	25,617	32,964	27,960	25,617	27,893	30,150	21,698	22,514	30,087	31,015	27,846	UD	33,577	28,422	22,821	33,620	23,521	30,932	22,630	26,690	20,662
				3	16,850	23,643	22,483	25,901	34,024	28,293	25,578	27,986	30,371	21,677	22,605	29,986	30,969	28,214	36,331	31,990	28,613	22,672	34,813	23,614	30,564	22,855	26,881	20,732
			3	1	17,251	24,245	22,274	25,103	31,924	29,013	26,877	27,464	31,641	22,354	23,421	31,973	31,944	28,449	35,369	31,696	28,863	23,550	34,739	22,863	34,773	23,048	27,424	21,407
				2	17,066	23,952	21,795	24,113	31,953	28,308	26,570	27,058	31,228	22,106	23,263	32,069	31,235	27,952	35,829	33,097	28,491	23,074	34,923	22,868	32,958	22,801	27,211	21,432
				3	17,017	UD	21,702	24,479	32,323	28,264	26,678	27,206	31,194	22,138	23,218	31,559	31,271	27,880	36,494	31,750	28,943	22,910	35,568	22,916	32,684	22,631	27,195	21,111
		NEGATIVE	1	1	16,887	24,438	22,648	24,965	33,230	28,500	28,126	28,115	30,842	22,916	24,383	29,101	30,554	29,818	37,132	34,149	28,518	24,374	31,890	22,363	31,365	23,127	27,822	21,378
				2	16,915	24,371	22,199	25,679	33,000	27,904	27,496	27,490	30,066	22,536	24,026	28,841	29,829	29,960	34,962	33,545	28,160	24,090	31,818	22,372	31,905	22,795	27,598	21,056
				3	16,989	24,166	22,167	25,662	32,802	28,119	27,500	27,613	30,665	22,643	24,043	28,910	30,277	29,936	35,638	34,243	27,921	24,361	31,572	22,446	31,332	22,963	27,782	21,414
			2	1	17,334	24,299	22,425	26,251	33,079	28,604	27,771	25,910	32,384	22,704	23,976	31,122	30,930	29,659	35,681	33,335	27,915	24,649	35,462	22,769	32,781	23,145	27,804	21,393
				2	16,901	24,506	21,942	25,579	33,808	28,264	26,781	25,725	31,926	22,459	23,564	30,370	30,787	29,390	35,751	32,709	27,456	24,050	34,338	22,297	33,003	23,102	27,918	21,224
				3	16,981	24,780	22,062	25,708	33,835	28,295	26,780	25,727	32,071	22,521	25,121	30,409	30,667	29,797	37,948	33,597	27,937	23,987	34,639	22,278	32,188	23,362	28,060	21,206
			3	1	16,859	24,687	22,439	25,712	32,679	28,685	27,497	26,267	31,684	22,670	24,316	29,546	30,668	29,666	35,788	34,111	28,053	24,941	34,190	22,159	32,818	23,584	28,091	21,873
				2	16,776	24,438	22,207	25,292	31,680	28,003	27,268	25,793	31,415	22,524	24,156	29,075	30,414	29,836	36,393	34,080	27,493	24,332	34,057	21,721	32,040	23,168	28,093	21,389
				3	16,974	24,698	11,791	25,630	32,034	28,337	27,683	25,919	31,407	22,640	24,271	29,310	30,287	29,616	35,496	33,101	27,801	24,396	33,730	21,934	32,611	23,475	28,050	21,503
		SSEA1	1	1	17,183	24,473	21,802	24,282	33,219	29,303	29,189	29,063	32,559	22,180	24,184	30,163	29,974	31,317	35,450	34,485	28,066	23,978	31,926	23,384	31,959	22,701	25,871	20,979
				2	16,699	24,210	21,413	24,746	31,880	29,067	28,242	28,570	32,720	21,878	23,529	28,998	29,689	31,042	35,419	32,449	27,427	23,089	31,457	22,698	31,230	22,451	25,675	20,852
				3	16,889	24,500	21,219	24,796	32,706	29,005	28,103	28,791	32,224	21,901	23,604	29,270	29,541	29,974	35,487	31,767	28,048	23,455	31,443	23,090	32,011	22,503	25,911	20,804
			2	1	16,842	24,993	22,480	25,896	32,621	29,194	28,446	26,132	32,917	22,418	23,861	30,797	30,344	33,112	35,481	35,584	28,020	23,965	34,239	22,874	33,230	23,470	26,236	21,135
				2	16,440	24,915	21,670	25,353	32,325	28,743	27,953	25,822	32,938	21,858	23,480	30,030	29,583	31,230	33,721	33,197	27,742	23,235	34,201	22,542	32,105	22,956	26,292	20,978
				3	16,487	25,115	22,133	25,348	31,762	28,751	27,996	25,871	33,290	22,228	23,596	30,223	29,820	31,395	35,963	32,567	27,625	23,397	34,403	22,589	32,412	23,303	26,527	20,962
			3	1	16,941	24,682	21,834	25,380	32,761	29,789	28,618	26,441	32,172	22,410	24,086	29,987	30,361	31,954	38,873	33,985	27,885	23,964	33,198	23,203	31,363	23,088	26,070	21,298
				2	16,760	23,981	21,723	25,204	31,818	29,615	28,654	26,146	32,194	22,069	23,669	29,619	29,832	30,764	34,645	32,460	27,477	23,408	33,276	22,911	31,991	23,063	25,655	20,987
				3	16,778	24,079	21,685	24,958	31,961	29,550	28,665	26,070	32,541	22,251	23,874	29,582	29,870	31,278	35,389	34,133	27,601	23,636	33,102	22,884	32,491	23,137	25,776	21,043
	8	TOTAL	1	1	17,966	25,258	21,573	25,289	33,901	28,175	28,865	29,392	31,292	22,862	24,107	28,361	32,917	28,764	UD	33,588	28,579	23,757	29,827	21,598	32,118	23,928	26,689	21,525
				2	17,717	25,398	21,283	25,013	32,410	27,408	27,950	29,225	30,855	22,334	23,495	28,017	32,403	28,009	38,294	35,777	28,617	23,298	29,690	21,344	32,395	23,329	26,431	21,437
				3	17,732	25,056	21,405	25,074	33,181	27,619	28,374	29,391	30,944	22,460	23,663	27,826	32,298	28,865	UD	32,956	28,569	23,225	29,672	20,981	32,645	23,645	26,528	21,533
			2	1	17,156	24,925	20,471	23,329	32,951	29,999	28,598	28,902	31,940	21,597	24,082	29,693	30,949	28,755	38,705	32,867	28,344	23,603	31,401	23,952	32,048	22,924	23,754	22,017
				2	16,915	24,646	19,960	23,226	32,810	29,451	28,111	28,530	32,445	21,209	23,272	28,892	30,949	28,862	35,925	33,134	27,766	23,315	31,136	23,778	31,742	22,468	23,445	21,674
				3	17,028	24,816	19,947	22,930	33,500	29,600	27,983	28,431	31,380	21,274	23,162	29,075	30,980	28,345	35,508	32,963	27,771	22,996	31,043	23,442	32,314	22,686	23,581	21,576
			3	1	17,301	24,915	21,037	23,772	32,466	29,436	27,445	29,185	31,999	22,486	25,285	28,937	30,418	27,772	36,540	32,846	28,468	24,270	32,652	22,878	31,118	23,076	24,187	21,528
				2	17,417	24,686	20,759	23,589	33,531	28,884	27,125	28,836	31,695	22,157	24,837	28,465	30,367	27,104	36,610	34,153	28,031	24,182	31,984	22,592	31,112	22,533	23,735	20,965
				3	17,279	24,972	20,741	23,599	32,616	28,691	27,176	29,031	31,548	22,272	24,727	28,762	30,175	26,967	36,359	32,052	28,140	23,835	32,116	22,562	29,656	22,560	23,933	21,259
		NEGATIVE	1	1	17,686	25,078	24,487	27,254	33,587	27,702	26,136	28,483	28,412	24,493	25,572	23,601	31,243	25,260	36,316	34,717	27,387	26,517	32,523	20,562	31,461	23,842	28,822	21,490
				2	17,056	24,722	23,944	26,815	32,723	27,005	25,769	28,351	27,933	24,315	24,991	23,180	31,042	25,484	36,610	35,445	27,506	26,179	32,132	20,141	31,695	23,308	28,161	21,293
				3	17,012	24,922	24,015	26,959	32,331	27,035	25,650	28,452	27,945	24,440	25,410	23,011	31,055	25,468	37,464	33,998	27,347	26,109	32,661	20,262	30,793	23,092	28,343	21,341
			2	1	16,928	25,305	24,581	26,914	31,579	27,036	27,295	29,093	27,078	24,890	26,297	25,709	29,846	27,330	37,349	35,401	27,765	24,380	32,298	22,055	30,026	23,208	28,667	20,932
				2	17,147	24,675	23,954	26,598	30,800	26,628	26,954	28,795	26,625	24,687	25,965	25,463	29,983	27,298	UD	34,042	27,349	24,590	31,950	21,815	29,885	22,811	28,263	20,739

		3	16,947	24,930	24,075	26,626	31,161	26,848	26,981	28,878	26,578	24,833	25,994	25,264	29,839	26,989	36,146	36,200	27,639	24,350	31,974	21,818	29,946	22,912	28,481	20,821
		1	17,536	25,224	23,424	26,522	32,403	27,623	27,413	27,421	28,298	24,927	25,959	27,266	30,632	28,304	35,247	35,568	27,479	24,386	32,872	22,014	30,013	23,127	27,470	20,949
	3	2	17,050	24,776	23,416	25,909	31,817	27,480	27,088	27,156	28,181	24,212	25,418	26,318	29,940	28,101	35,703	35,674	27,382	23,898	32,432	21,762	30,058	22,844	27,232	20,814
		3	16,941	24,870	23,036	25,986	31,373	27,084	27,263	27,069	28,283	24,217	25,385	26,578	30,125	27,782	UD	36,744	27,076	23,799	31,868	21,848	29,920	22,906	27,522	20,852
		1	17,239	25,534	21,800	25,748	33,255	28,956	29,696	28,624	32,612	22,694	24,701	27,875	30,355	30,569	34,966	39,508	27,759	24,220	31,977	23,894	33,096	24,314	27,132	21,589
	1	2	16,969	24,909	21,335	24,932	32,869	28,441	29,344	28,030	32,149	22,242	24,328	27,482	29,975	30,875	35,778	37,176	27,857	23,912	30,983	23,587	31,904	23,921	26,880	20,985
		3	16,289	25,125	21,423	25,284	32,955	28,584	29,549	28,283	32,372	22,255	24,247	27,627	29,427	30,183	34,750	34,370	27,658	23,785	31,435	23,373	32,896	24,147	27,106	21,191
		1	17,658	24,969	22,391	25,898	30,979	29,736	29,158	29,977	31,787	23,272	25,573	28,131	30,898	30,972	UD	35,775	27,542	23,956	32,517	24,798	31,786	23,178	26,274	21,080
	2	2	16,991	24,255	21,662	25,510	30,976	29,072	28,987	29,094	31,701	23,105	25,402	27,771	30,209	32,111	35,569	36,925	27,091	23,716	31,832	24,111	30,539	22,949	25,914	20,329
		3	16,990	24,635	22,136	25,679	31,084	29,047	29,005	28,999	32,073	23,292	25,322	27,834	30,028	31,402	36,924	37,147	26,975	23,765	31,898	24,682	32,277	23,223	26,003	20,387
		1	17,299	24,925	21,517	25,131	33,780	29,958	29,686	27,647	33,242	22,266	24,884	27,243	30,480	30,423	35,674	34,697	27,696	24,191	32,496	24,751	30,997	23,266	24,911	21,068
	3	2	16,934	24,217	20,826	24,453	32,442	29,620	29,202	27,020	32,732	22,208	24,608	26,842	29,998	30,174	34,616	33,203	26,996	23,562	32,014	24,294	30,301	22,923	24,572	20,776
		3	17,021	24,569	21,240	24,556	32,139	29,500	29,300	27,377	32,969	22,273	24,507	26,899	29,983	30,078	35,941	36,851	26,940	23,883	31,676	24,266	30,448	23,213	24,672	20,967
		1	18,293	24,851	22,619	25,108	31,431	28,402	27,173	28,498	31,278	23,170	24,921	31,421	31,408	27,921	UD	32,177	28,788	23,200	32,513	22,205	30,637	23,075	27,979	21,475
	1	2	17,529	24,405	22,100	24,801	30,761	27,599	26,817	27,887	30,122	22,889	24,291	30,588	31,070	27,646	UD	32,403	27,929	22,793	31,385	21,667	29,938	22,645	27,197	21,298
		3	17,542	24,334	22,003	24,985	31,532	27,601	27,117	27,871	30,720	22,972	24,258	30,286	30,762	27,509	36,798	31,982	28,057	22,873	31,410	21,760	30,145	22,940	27,452	21,027
		1	17,447	24,415	22,260	25,374	33,189	27,668	27,002	28,716	30,506	21,632	23,071	30,163	30,010	28,000	36,870	32,364	28,438	22,515	30,068	23,451	29,220	22,803	26,290	21,045
	2	2	17,167	24,472	21,799	24,915	32,688	26,922	26,350	28,650	30,094	21,474	22,629	29,892	29,680	28,030	38,730	32,332	27,516	21,959	29,778	23,368	28,737	22,637	26,166	20,738
		3	17,221	24,967	21,776	24,983	32,850	26,884	26,390	28,558	30,188	21,537	22,769	30,150	29,681	28,252	35,307	36,603	28,172	21,973	29,821	23,275	29,026	22,867	26,239	20,880
		1	17,922	25,014	22,689	25,347	32,102	28,688	26,523	28,992	30,980	23,407	25,378	30,908	31,260	28,031	UD	33,511	28,569	23,202	32,971	22,378	30,579	23,159	27,048	21,050
	3	2	17,498	24,304	21,759	24,522	31,177	27,820	25,847	28,674	30,638	22,851	24,697	30,525	31,552	27,674	UD	33,438	28,010	22,986	32,442	22,361	30,544	22,816	26,915	20,967
		3	17,461	24,708	21,758	24,579	31,719	27,637	26,002	28,809	30,168	23,115	24,861	30,006	31,175	27,830	36,198	34,548	27,990	22,976	32,188	22,319	30,101	22,948	26,950	21,012
		1	17,506	25,049	22,983	26,797	31,578	26,488	27,585	28,120	28,438	24,273	24,973	28,923	29,510	28,569	37,460	35,263	27,607	23,822	31,961	22,158	30,076	23,156	29,509	20,909
	1	2	17,239	24,480	22,803	26,503	31,008	26,163	27,305	27,656	28,057	24,249	24,689	28,439	29,815	28,157	UD	35,751	27,159	23,834	32,139	22,156	30,212	23,026	29,450	20,758
		3	17,265	24,626	22,801	26,665	31,022	26,175	27,568	27,805	28,137	24,130	24,889	28,504	29,596	28,363	37,728	35,699	27,146	24,137	31,802	22,166	30,285	23,161	29,709	20,722
		1	17,919	24,972	24,619	28,050	32,311	26,783	28,565	26,660	29,655	25,605	26,983	31,746	30,976	30,082	35,642	34,178	27,523	24,789	33,591	23,542	31,424	23,940	29,979	20,872
	2	2	17,216	24,958	23,931	27,595	32,130	26,334	28,408	26,168	29,288	25,447	26,468	31,430	30,404	29,420	36,377	33,900	26,837	24,256	33,420	23,408	30,558	23,440	30,057	20,763
		3	17,778	UD	24,152	27,583	31,266	26,346	28,355	26,093	29,624	25,554	26,388	31,540	30,758	30,316	UD	34,187	27,439	24,337	33,183	23,587	30,521	23,622	29,981	20,903
		1	18,193	24,336	23,863	27,281	31,687	27,341	27,945	26,673	30,778	25,382	27,050	29,329	30,987	29,542	UD	38,967	27,738	24,044	32,501	23,050	31,889	23,275	29,395	20,543
	3	2	17,749	25,044	23,147	26,730	31,126	26,480	27,137	26,266	30,381	25,298	26,529	29,212	30,964	29,299	37,352	36,501	26,867	23,616	32,758	22,601	31,767	23,095	28,977	20,573
		3	18,000	24,736	23,409	27,322	30,528	26,585	27,386	26,340	30,118	25,380	26,646	28,949	31,103	29,184	35,808	36,502	27,035	23,736	31,780	22,648	31,587	23,285	28,978	20,572
		1	17,696	24,390	22,817	26,580	33,467	27,513	29,339	28,942	32,552	22,637	24,251	31,106	29,095	31,286	36,013	32,789	28,618	23,607	31,651	24,096	31,335	23,280	27,363	20,960
	1	2	17,013	24,420	22,110	26,074	33,959	27,422	28,997	28,486	31,916	22,259	23,848	30,706	28,667	30,952	34,715	33,085	27,059	23,290	31,367	23,817	31,104	22,963	26,817	20,844
		3	17,128	24,057	21,972	26,107	32,953	27,155	29,478	28,652	32,163	22,602	23,958	30,761	28,855	31,093	35,871	34,267	27,782	23,230	31,486	23,832	31,292	23,160	26,882	20,850
		1	17,674	25,845	23,024	26,628	33,965	28,117	29,568	26,526	31,932	22,750	24,472	30,628	29,356	31,452	36,202	36,212	27,894	23,718	31,985	24,563	31,862	24,052	27,748	21,220
	2	2	17,129	25,180	22,407	26,366	33,174	27,668	29,473	26,289	31,926	22,457	23,937	30,583	29,216	31,240	36,414	34,247	27,323	23,221	31,229	24,335	30,511	23,565	27,412	20,910
		3	17,103	25,317	22,644	26,117	34,341	27,768	29,659	26,211	31,792	22,424	23,985	30,989	29,364	31,181	35,759	35,372	27,880	23,189	31,204	24,391	30,218	23,720	27,378	20,986
		1	17,619	23,908	22,360	26,213	32,215	28,353	29,508	26,154	32,261	22,907	24,270	29,644	29,448	31,553	35,397	33,979	27,794	23,452	30,440	24,204	30,273	23,182	26,831	20,983
	3	2	17,163	24,434	22,156	25,809	30,618	27,885	29,109	26,004	31,990	22,667	23,960	29,674	29,109	30,748	38,754	37,969	27,383	22,980	31,022	24,036	30,362	22,952	26,974	20,595
		3	17,133	24,659	22,011	25,775	31,320	27,973	29,443	26,092	32,337	22,786	24,102	29,593	29,288	31,307	35,541	33,906	27,577	23,085	30,635	23,651	30,338	23,128	26,804	20,744
		1	17,139	23,892	23,835	26,672	32,983	29,368	28,503	29,696	31,938	22,414	23,926	34,326	31,978	27,967	UD	31,425	28,761	23,905	36,787	21,558	33,956	22,172	29,877	20,866
	1	2	16,731	24,257	23,294	26,170	32,858	28,949	28,090	29,392	31,894	22,132	23,607	35,640	31,484	27,793	36,702	31,697	28,316	23,236	36,036	21,427	34,592	22,760	29,411	20,428
		3	17,156	24,496	23,247	26,182	32,666	28,541	28,320	28,909	31,996	22,381	23,681	35,165	31,529	28,185	35,694	32,603	28,467	23,458	36,495	21,265	32,294	22,809	28,717	20,748
		1	18,531	25,297	23,200	26,068	32,070	29,561	27,560	28,142	31,542	23,702	25,225	35,949	32,760	28,492	UD	38,106	29,137	23,943	36,031	23,390	32,873	23,805	29,616	22,030
	2	2	17,797	24,755	22,689	25,646	32,203	28,619	27,175	27,877	31,247	23,475	24,993	39,307	32,964	28,129	37,231	33,831	28,408	23,978	36,669	22,871	33,348	23,617	29,665	21,300
		3	17,958	24,881	22,972	25,675	32,448	29,129	27,196	28,091	31,522	23,418	24,916	35,512	32,319	28,136	34,710	34,482	28,682	23,815	35,976	22,913	32,972	23,762	30,100	21,803
		1	16,910	24,937	24,637	26,653	33,082	30,464	27,342	29,357	31,664	23,058	24,969	36,960	32,494	27,915	35,296	31,730	28,247	24,276	36,365	20,029	33,146	23,306	30,042	20,884

RbIPSC																														
B19																														
NEGATIVE	1	2	16,301	24,289	24,121	26,379	31,381	29,630	27,147	29,130	31,415	22,902	24,657	38,024	32,310	27,862	34,418	32,735	28,371	23,637	35,556	19,966	32,084	22,988	30,479	20,838
		3	15,508	24,468	23,980	26,314	32,267	30,232	27,207	28,814	31,583	22,874	24,889	35,938	31,897	27,976	35,241	33,851	28,488	23,938	36,365	20,179	31,637	23,114	30,325	20,830
	2	1	17,154	25,364	23,556	26,970	32,004	29,993	29,233	28,987	33,675	23,250	25,707	34,822	31,107	29,987	35,705	33,998	28,174	24,791	36,642	22,926	34,579	23,742	30,109	21,302
		2	16,584	24,134	22,899	26,582	31,711	29,508	28,993	28,462	32,967	22,699	25,187	33,024	30,704	29,202	37,090	33,825	27,418	24,965	37,903	22,690	33,564	23,387	29,887	20,962
		3	17,280	24,611	22,927	26,355	31,507	29,244	29,300	29,051	33,343	22,815	25,200	33,929	30,953	29,938	35,980	31,810	27,382	24,930	36,769	22,820	33,892	23,623	29,794	21,074
	3	1	17,041	24,683	22,752	26,728	32,938	28,720	28,790	25,568	32,586	23,659	25,490	33,941	31,110	30,022	35,221	36,403	27,321	24,620	36,301	23,427	31,881	23,423	29,627	21,140
		2	16,774	24,510	22,397	26,534	31,995	28,693	28,323	25,430	32,053	22,999	24,938	32,702	30,819	30,074	35,717	35,786	27,631	24,109	35,502	22,994	32,449	23,055	29,393	20,823
		3	16,855	24,793	22,460	26,318	33,059	28,526	28,356	25,567	31,977	23,289	24,930	32,643	30,413	29,833	36,381	34,083	27,136	24,204	37,190	23,270	32,206	23,219	29,685	20,990
	4	1	17,412	25,037	23,306	27,040	33,775	29,410	29,180	27,744	32,236	23,554	26,058	34,448	30,229	30,955	UD	36,524	28,387	24,698	36,754	25,491	34,021	23,363	29,699	21,140
		2	17,263	24,447	22,865	26,456	32,472	28,682	28,716	27,320	32,129	23,282	25,740	32,961	29,934	30,608	37,518	34,097	27,501	24,244	36,902	24,934	33,236	23,339	29,141	20,954
		3	17,004	24,686	22,499	26,978	32,900	28,914	28,835	27,577	32,233	23,327	25,993	31,838	29,892	30,674	35,390	35,526	27,773	24,340	37,036	25,092	34,526	23,471	29,469	20,989
SSEA1	1	1	17,273	24,470	26,317	26,997	32,842	31,786	31,044	29,895	34,668	23,116	25,303	34,260	31,758	31,061	37,521	33,284	28,012	25,229	35,956	24,035	33,130	23,648	29,117	21,432
		2	16,509	24,437	23,896	26,593	33,176	30,962	30,708	28,890	34,571	22,935	24,940	33,695	31,454	31,412	37,558	33,449	27,777	24,938	36,595	23,652	32,689	23,410	28,732	21,115
		3	16,529	24,750	23,711	26,509	32,730	31,539	30,991	29,237	34,608	22,986	24,843	34,019	31,377	31,217	35,761	35,695	27,359	24,697	35,733	23,396	33,959	23,610	28,830	21,115
	2	1	16,957	24,575	23,021	26,618	31,961	29,315	29,745	26,799	32,546	22,663	25,509	34,064	30,533	31,285	34,343	35,727	27,855	23,818	35,519	23,386	32,212	23,092	28,932	21,142
		2	16,757	24,537	23,090	26,199	30,837	29,011	29,385	26,401	32,051	22,633	23,728	32,445	30,161	32,255	35,822	34,076	27,188	23,425	35,093	23,345	32,633	22,981	27,832	20,861
		3	16,465	24,305	22,926	26,400	31,394	29,252	29,764	26,515	33,221	22,525	24,164	33,808	30,183	31,334	35,222	33,239	27,204	23,521	35,676	23,218	31,801	23,230	27,995	21,055
	3	1	17,461	23,987	23,028	26,367	32,162	28,992	28,959	25,109	31,969	22,985	26,070	33,225	29,646	30,473	36,539	35,446	27,922	24,047	36,328	24,904	34,991	23,560	29,362	21,234
		2	17,273	24,311	22,775	26,604	32,511	28,703	28,425	24,712	31,989	22,909	25,235	33,685	29,459	30,830	UD	34,650	27,201	23,820	36,714	24,763	32,255	22,944	28,836	20,853
		3	16,954	24,779	22,813	26,525	32,172	28,363	28,271	24,804	32,592	22,998	25,259	33,530	29,259	30,132	35,668	35,351	27,378	23,894	35,073	24,514	32,899	23,335	29,155	20,952
NEGATIVE	1	1	16,973	24,943	21,072	23,555	35,052	28,261	26,423	23,781	32,637	21,832	23,343	27,683	30,873	27,891	34,347	32,646	29,219	24,976	33,108	19,540	30,289	23,576	24,650	23,180
		2	16,817	24,342	20,685	23,289	34,165	28,115	25,741	23,479	32,295	21,628	22,645	27,111	30,822	26,977	33,446	32,335	28,506	24,614	32,823	18,896	29,910	23,143	24,318	22,965
		3	16,982	24,575	20,861	23,414	34,099	28,018	26,033	23,479	32,358	21,738	22,691	27,200	30,806	27,601	34,136	33,929	29,354	24,809	32,607	18,895	30,182	23,761	24,438	23,143
	2	1	16,758	24,430	19,789	23,279	34,901	29,018	26,613	23,692	33,448	20,977	24,206	26,451	28,736	27,000	32,463	32,628	28,701	25,636	34,090	21,374	29,150	23,226	22,481	21,991
		2	14,869	24,078	19,437	22,826	33,425	28,628	26,064	23,307	32,536	20,559	23,565	25,949	28,470	26,731	32,502	32,362	27,910	25,181	34,082	21,024	28,342	23,033	22,073	22,047
		3	16,079	24,405	19,388	22,945	34,526	28,592	26,539	23,202	32,324	20,660	23,619	25,976	28,412	26,691	32,634	31,690	28,637	25,121	33,008	21,140	28,177	23,076	22,331	22,006
	3	1	16,655	24,714	20,210	23,200	33,642	28,338	26,088	23,888	31,912	21,302	23,461	24,124	29,778	27,076	32,759	33,349	28,985	25,666	32,843	19,307	29,127	22,939	23,354	21,935
		2	16,042	23,945	19,727	22,371	33,335	27,793	25,647	23,529	32,084	20,972	23,516	22,987	29,328	26,645	34,415	33,102	27,410	25,191	32,826	19,110	28,922	22,912	22,872	21,792
		3	16,321	24,142	19,984	22,634	32,963	27,814	25,808	23,646	31,591	21,051	23,669	23,338	29,161	26,816	33,659	32,112	28,344	25,596	32,734	19,330	28,904	22,968	23,229	21,718
SSEA1	1	1	16,928	24,038	18,728	22,441	32,745	30,029	28,751	23,657	33,815	20,422	23,264	26,660	29,245	28,585	32,748	31,984	28,544	25,394	32,772	22,975	28,825	22,696	22,416	25,651
		2	15,375	23,950	18,532	21,682	33,191	29,527	28,796	22,886	33,778	20,035	23,174	26,305	28,860	28,125	32,711	31,629	27,917	24,911	32,743	22,582	28,548	22,558	22,043	25,385
		3	16,444	23,622	17,167	21,784	33,583	29,365	28,745	23,004	33,481	20,149	23,052	26,529	28,883	27,933	33,023	31,993	28,139	24,968	33,030	23,212	28,826	22,742	22,132	25,659
	2	1	16,344	24,161	19,198	22,935	35,700	30,769	28,050	23,166	34,138	20,496	24,509	26,337	27,659	29,202	32,940	33,364	28,576	25,990	33,921	26,176	27,923	22,862	21,602	27,341
		2	15,951	24,262	18,580	22,546	33,328	30,900	27,613	22,636	33,634	19,889	24,038	25,921	27,348	28,467	31,929	32,715	27,937	25,486	33,852	25,671	27,731	22,844	21,549	27,056
		3	15,196	24,443	18,618	22,752	34,664	31,140	27,948	22,764	33,966	20,126	24,120	26,140	27,383	28,819	32,651	31,920	28,157	25,611	34,082	25,907	27,971	22,906	21,569	27,115
	3	1	17,148	24,181	18,818	22,067	33,888	30,542	28,604	23,069	33,267	20,375	24,322	26,094	28,547	29,908	32,643	32,569	28,985	25,762	32,763	23,861	28,429	22,805	22,116	25,687
		2	16,992	23,857	18,344	21,822	33,289	30,455	28,282	22,830	33,126	20,009	23,803	25,517	28,056	28,990	32,963	32,378	27,973	25,411	32,546	23,730	28,202	22,414	21,786	25,467
		3	16,973	23,940	18,510	21,678	33,137	30,777	28,210	22,883	32,927	20,059	23,888	25,667	27,863	29,341	32,364	32,355	28,019	25,283	32,238	23,765	28,132	22,570	21,848	25,757
SSEA4	1	1	17,600	23,992	18,801	22,395	34,412	30,693	28,305	22,751	33,073	20,623	23,976	28,941	29,339	28,474	33,992	32,577	28,275	27,333	32,635	22,201	29,599	23,196	22,058	24,949
		2	17,202	23,966	18,869	21,977	34,202	29,555	27,515	22,351	32,827	20,211	23,409	28,078	28,845	28,311	32,391	31,704	28,041	26,687	32,429	22,079	28,977	22,894	21,600	24,589
		3	17,257	24,490	18,795	21,768	32,330	30,149	27,672	22,099	32,960	20,308	23,831	28,046	29,200	28,109	32,767	31,702	28,076	27,004	32,379	22,199	29,108	23,037	21,880	24,794
	2	1	17,005	24,173	18,710	23,351	33,252	31,392	28,225	22,523	33,426	20,817	24,970	28,557	28,657	27,971	32,358	31,598	28,640	26,906	33,596	25,329	28,695	23,288	21,477	26,531
		2	16,537	24,367	18,071	22,736	33,464	31,463	27,811	22,321	32,477	20,385	24,780	28,407	27,857	27,682	31,907	31,429	27,733	26,391	33,717	24,988	28,278	22,935	20,962	26,494
		3	16,544	24,937	18,107	22,668	33,477	31,905	27,862	22,235	32,527	20,551	24,792	28,296	28,023	27,898	31,998	31,795	28,236	26,441	33,676	25,047	28,155	23,078	21,073	26,592
	3	1	17,136	24,175	18,685	21,982	35,321	30,869	28,151	22,855	33,416	20,309	24,379	27,102	28,547	28,575	32,878	31,788	28,167	26,940	32,505	23,391	28,062	22,914	22,198	25,132
		2	16,895	23,970	18,571	21,491	33,234	30,419	27,532	22,962	32,972	20,130	24,062	26,555	27,981	28,296	31,730	31,471	27,676	26,570	32,153	23,321	27,937	22,399	21,108	24,969
		3	16,811	24,113	18,746	21,634	32,996	30,101	27,981	22,086	32,615	20,151	24,046	26,586	28,160	28,503	31,696	32,115	27,989	26,536	32,294	23,408	28,235	22,648	21,529	25,183

		1	17,063	23,923	18,894	22,180	33,171	31,144	29,263	22,945	33,836	20,387	19,974	24,325	27,917	29,500	28,361	32,970	32,052	29,145	26,685	33,627	24,427	28,425	22,592	22,357	26,903
	1	2	16,906	23,651	18,331	21,520	32,391	30,458	28,723	22,659	33,249	19,974	24,030	27,549	28,956	27,800	33,358	30,767	27,968	26,306	33,492	24,046	28,870	22,511	21,733	26,501
		3	16,891	23,925	18,504	21,643	33,905	30,857	28,518	22,789	33,497	20,101	24,076	27,689	29,150	28,068	32,906	32,471	27,988	26,437	32,936	24,093	28,880	22,549	21,950	26,827
		1	16,920	24,300	18,781	22,705	35,295	31,538	28,330	22,941	34,077	20,309	24,835	27,562	27,996	28,432	31,995	32,301	28,345	26,537	34,281	26,515	28,085	23,137	21,823	27,580
	2	2	16,591	23,971	18,592	22,588	33,728	31,589	27,878	22,468	33,360	19,966	24,708	27,318	27,362	28,572	32,672	32,375	27,485	26,002	34,308	26,291	27,660	22,810	21,244	27,464
		3	16,695	24,124	18,541	22,460	34,436	31,048	27,915	22,528	33,473	19,972	24,664	27,472	27,380	28,136	32,049	32,581	28,101	25,926	33,352	26,275	27,720	23,070	21,554	27,540
		1	17,009	24,101	18,591	21,508	33,136	30,712	28,462	22,892	33,464	20,322	24,619	26,979	28,700	29,264	32,144	32,160	27,956	26,663	33,177	25,120	28,194	22,593	21,459	26,320
	3	2	16,485	23,833	17,963	21,795	32,996	30,510	28,326	22,457	32,600	19,909	24,161	26,445	28,179	29,009	32,058	32,704	27,416	26,221	32,649	24,691	27,881	22,257	21,153	26,306
		3	16,361	23,934	17,963	21,551	33,739	30,069	28,414	22,568	33,166	20,082	24,260	26,465	28,353	28,831	32,168	31,591	28,092	26,295	32,857	24,667	27,979	22,920	21,324	26,276
		1	17,248	24,947	20,301	22,964	33,866	27,719	26,377	22,684	28,970	21,419	25,125	23,938	29,497	27,795	33,376	32,391	28,287	27,959	32,559	20,112	28,300	23,296	22,511	23,189
	1	2	16,423	24,305	19,542	22,634	33,112	27,220	25,886	22,350	28,915	20,891	24,862	23,306	28,963	27,459	33,181	32,905	28,069	27,571	32,038	19,844	27,863	23,105	21,902	23,060
		3	16,738	24,768	19,460	22,611	33,667	27,424	25,972	22,452	28,743	20,996	24,901	23,417	29,087	27,291	32,757	34,253	28,226	27,716	32,098	19,880	28,068	23,210	22,177	22,927
		1	17,115	24,930	16,465	23,792	34,055	28,062	24,941	22,962	29,321	21,626	26,079	22,468	30,885	28,116	33,372	32,745	28,566	28,903	33,663	18,821	29,315	23,489	22,545	22,626
	2	2	16,827	24,220	19,928	23,226	32,675	27,543	24,792	22,457	28,409	21,325	25,826	21,853	30,387	27,270	33,402	31,801	28,518	28,164	33,584	18,720	29,597	23,133	22,387	22,708
		3	16,755	24,622	19,851	23,164	32,573	27,473	24,979	22,531	28,963	21,321	25,728	22,078	30,032	27,771	33,697	32,627	28,179	28,147	33,467	18,612	28,913	23,383	22,392	22,729
		1	17,286	24,364	19,098	22,433	33,379	28,143	27,869	22,769	30,745	20,687	25,081	26,267	28,702	28,858	32,993	33,545	28,350	26,744	31,369	20,966	27,609	23,294	21,784	24,029
	3	2	16,995	24,077	18,713	21,873	32,856	27,681	27,355	22,516	30,755	20,428	24,534	25,733	28,214	28,353	32,601	32,338	28,139	26,376	31,358	20,665	27,828	22,824	21,390	23,869
		3	16,906	24,184	18,830	21,968	32,874	27,797	27,657	22,380	30,681	20,466	24,768	25,699	28,280	28,449	32,492	37,198	27,965	26,469	31,328	20,749	27,482	23,038	21,459	23,949
		1	17,429	24,628	18,842	22,493	36,251	30,731	28,481	22,116	32,759	20,448	24,863	28,240	28,615	30,432	33,353	32,156	28,550	27,083	31,519	23,971	27,959	23,221	21,953	26,311
	1	2	16,923	24,003	18,526	21,973	33,682	29,645	28,110	21,681	32,903	20,122	24,557	27,018	28,101	29,866	32,265	32,447	27,789	26,847	31,575	23,507	27,865	22,724	21,468	26,531
		3	16,584	24,352	18,557	22,029	33,273	29,859	28,355	21,742	32,190	20,191	24,728	27,395	28,095	29,608	33,840	33,968	28,104	26,778	31,559	23,522	28,002	22,953	21,729	26,684
		1	17,611	24,500	18,994	22,275	34,991	30,191	27,784	22,701	32,073	20,400	26,427	26,477	28,629	29,613	32,647	30,849	28,450	28,994	32,579	23,121	28,744	23,114	21,609	26,167
	2	2	17,170	24,220	18,624	21,565	33,986	30,289	27,752	22,381	31,676	20,003	26,391	26,112	28,960	29,804	31,834	31,841	27,663	28,836	32,288	22,956	28,299	22,908	21,338	26,167
		3	17,089	24,530	18,463	21,623	33,582	30,201	27,644	22,339	31,969	20,158	26,684	26,167	28,860	29,953	32,567	31,994	27,813	28,507	32,315	23,057	28,678	22,960	21,533	26,183
		1	16,927	24,203	19,193	22,403	34,566	30,143	29,272	22,621	33,227	20,151	24,962	27,339	28,027	29,748	31,786	33,528	28,102	26,901	31,518	24,672	31,261	26,430	21,842	29,937
	3	2	16,906	24,196	18,441	21,781	34,523	29,816	28,711	22,271	32,718	19,990	24,478	26,546	27,653	29,222	31,748	32,078	27,669	26,410	31,204	24,371	32,672	26,165	21,350	29,303
		3	16,829	24,609	18,559	21,880	34,879	29,403	28,813	22,134	32,823	20,015	24,597	26,625	27,810	29,845	32,285	32,945	27,627	26,453	30,987	24,620	31,469	26,140	21,451	29,787
		1	17,216	24,269	19,143	22,203	35,697	29,220	28,567	22,246	32,600	20,387	26,298	28,106	28,684	28,947	32,441	32,675	28,435	28,121	32,277	23,721	27,870	23,071	21,390	26,513
	1	2	17,021	24,247	18,576	21,804	33,672	29,177	28,100	21,829	32,228	20,222	25,828	27,859	28,386	28,980	31,523	31,975	27,637	27,768	32,441	23,823	27,488	22,891	20,990	26,595
		3	16,923	24,253	18,742	21,587	33,287	29,014	28,370	21,904	32,154	20,125	25,947	27,965	28,359	28,727	31,697	32,309	27,949	27,872	32,951	23,481	27,597	22,919	21,312	26,483
		1	17,803	24,924	19,151	22,813	33,636	29,372	27,885	22,963	32,966	21,032	27,771	26,988	29,724	29,801	32,050	33,481	28,570	29,268	33,127	22,529	29,481	23,345	21,216	25,564
	2	2	17,618	24,369	18,460	22,058	32,223	28,353	27,273	22,443	32,177	20,442	27,230	26,112	29,560	29,588	32,665	32,688	28,017	28,979	33,215	22,028	28,807	23,361	21,393	25,984
		3	17,552	24,717	18,377	22,203	34,076	28,555	27,386	22,610	32,261	20,566	27,270	26,341	29,587	29,287	31,340	32,686	28,090	28,729	32,999	21,893	28,963	23,403	21,491	25,639
		1	16,911	24,530	17,968	21,466	31,318	27,985	28,122	22,984	32,147	19,560	25,133	28,985	27,832	28,626	32,286	30,959	27,298	28,160	32,286	24,461	27,888	23,398	21,569	26,060
	3	2	16,352	23,920	17,767	20,777	31,138	27,873	27,634	22,557	32,472	19,198	24,628	27,283	27,632	28,485	32,259	31,879	26,496	27,403	31,916	24,273	27,904	23,103	21,091	25,886
		3	16,416	24,133	17,796	20,898	31,686	27,468	27,956	22,659	32,012	19,352	24,625	27,745	27,361	28,312	32,965	31,893	27,030	27,531	32,066	23,420	27,288	23,337	21,316	25,755
		1	16,161	24,733	18,143	21,984	33,487	29,672	27,922	22,506	31,632	19,426	24,922	27,830	27,636	29,509	32,972	32,643	27,678	28,166	32,975	24,725	28,306	23,429	21,745	26,828
	1	2	16,051	24,430	17,890	21,550	33,753	28,660	27,289	22,084	31,763	19,310	24,538	27,493	27,302	29,212	32,467	32,437	26,356	27,962	32,441	24,704	28,182	22,942	21,512	26,942
		3	15,948	24,967	18,298	21,471	35,446	29,371	27,690	22,178	31,399	19,429	24,667	27,428	27,416	29,423	32,421	32,981	26,948	27,903	32,370	24,814	28,391	23,051	21,787	26,925
		1	16,853	24,171	18,183	21,442	32,766	29,274	27,650	22,875	32,696	19,472	24,955	27,122	27,669	29,521	32,973	32,050	27,079	28,447	31,880	24,942	28,125	23,832	21,364	26,990
	2	2	16,412	23,968	17,886	21,177	32,132	28,853	27,436	22,401	32,352	19,326	24,601	26,538	27,361	29,669	31,493	32,588	26,594	27,902	31,405	23,820	27,871	22,516	21,148	26,156
		3	16,224	24,172	18,281	21,291	32,005	29,732	27,294	22,571	32,165	19,321	24,512	26,853	27,268	29,663	32,265	33,328	26,870	27,977	31,401	23,971	27,665	22,927	21,194	26,146
		1	16,431	24,264	17,995	21,562	32,976	29,305	28,217	22,542	32,360	18,712	24,488	27,450	27,432	29,017	32,546	31,753	27,175	28,089	31,402	24,623	28,387	23,367	21,317	26,494
	3	2	15,786	23,682	17,686	20,914	32,802	28,491	27,894	22,409	32,269	18,407	24,237	26,830	26,952	29,040	32,880	34,366	26,566	27,526	31,364	24,413	28,600	22,810	21,139	25,973
		3	16,187	23,805	17,575	20,991	31,947	28,424	27,759	22,184	32,014	19,084	24,294	26,751	27,100	28,666	32,566	32,449	26,746	26,714	31,678	24,331	27,610	22,939	21,234	25,974
		1	16,453	24,738	19,841	23,382	33,636	28,560	24,649	23,084	28,001	20,349	24,901	21,237	28,753	26,916	33,988	31,448	27,519	28,488	34,180	19,743	28,937	23,455	22,239	22,048
	1	2	15,982	24,181	19,119	22,328	32,706	28,110	24,338	22,817	27,633	20,054	24,832	20,777	28,723	26,584	32,847	36,854	27,147	28,092	33,671	19,551	28,580	22,901	22,447	21,910

B29	B24	
NEGATIVE	SSEA1/SSEA4	
	SSEA4	
	SSEA1	
	NEGATIVE	
	SSEA1/SSEA4	

				3	16,000	24,568	19,267	22,431	33,723	28,408	24,448	22,891	27,625	20,121	25,017	20,934	28,788	26,585	33,118	36,308	26,964	27,991	33,618	19,429	28,396	23,008	22,337	21,933
			2	1	16,544	26,033	20,972	24,439	32,477	29,832	23,686	23,219	27,076	20,990	25,973	20,944	28,977	28,049	33,116	34,321	27,483	29,416	35,058	20,268	29,406	23,822	23,430	21,986
				2	16,271	25,756	20,678	24,052	32,253	29,481	23,507	22,866	27,380	20,895	25,275	20,473	28,749	27,353	34,789	32,505	27,227	29,037	34,534	20,272	28,971	23,423	23,145	21,907
				3	16,135	25,632	20,636	23,975	32,794	29,385	23,618	22,783	27,198	20,909	25,354	20,658	29,068	27,550	33,631	37,582	27,512	29,311	35,558	20,168	29,390	23,580	23,280	21,816
			3	1	16,860	25,214	19,939	23,287	33,221	28,939	25,861	23,791	27,914	20,717	23,464	23,670	29,881	26,552	34,915	33,337	27,469	27,287	34,226	19,963	31,237	23,973	23,071	23,303
				2	16,329	24,363	19,438	22,884	34,753	28,237	25,216	23,568	27,566	20,235	23,191	23,179	28,837	26,062	33,093	31,980	26,778	26,736	33,825	19,568	30,603	23,509	22,742	23,031
				3	16,643	24,672	19,468	22,935	33,076	28,247	25,534	23,367	27,692	20,301	23,166	23,307	28,991	26,192	34,971	32,524	27,084	27,042	34,393	19,465	30,234	23,662	22,821	23,032
		SSEA1	1	1	16,745	24,656	18,364	22,024	33,724	30,382	28,282	23,337	31,928	19,741	25,669	26,083	28,280	29,910	32,898	32,042	27,212	28,883	33,699	23,907	29,073	23,580	21,482	26,188
				2	16,458	24,119	17,732	22,011	33,880	29,239	27,675	23,051	32,005	19,649	25,398	25,213	27,798	29,815	32,997	31,879	26,522	27,817	33,014	23,641	28,347	23,125	21,389	26,046
				3	16,531	24,401	17,687	22,224	32,487	30,107	27,541	23,203	32,155	19,061	25,292	25,587	28,250	29,841	33,284	31,331	27,092	28,145	33,968	23,586	28,754	23,365	21,528	26,256
			2	1	16,540	25,214	18,492	22,908	32,358	30,355	27,625	23,613	32,080	19,515	26,342	25,159	27,403	30,879	34,092	32,514	26,736	28,359	33,902	24,884	28,882	23,634	21,997	25,955
				2	16,210	24,034	18,196	22,599	32,874	29,712	27,451	22,484	31,540	20,194	25,716	24,695	27,028	30,975	32,967	33,287	26,588	27,785	33,610	24,338	27,968	23,864	20,928	25,767
				3	16,036	24,514	18,085	22,584	34,070	29,924	27,070	22,994	31,628	19,013	25,944	24,834	27,175	30,377	33,541	32,033	26,487	27,891	32,770	24,332	27,929	23,915	21,335	25,786
			3	1	16,903	24,908	18,549	22,484	32,627	29,896	27,916	23,835	31,637	20,012	24,122	26,606	28,398	30,356	33,422	32,109	26,569	26,792	34,352	23,335	29,164	23,902	21,870	26,260
				2	16,315	23,980	18,249	21,925	32,918	30,085	27,843	23,299	31,124	19,981	23,886	26,253	28,267	29,540	33,395	32,330	27,270	26,655	33,340	23,143	29,044	23,459	21,654	26,248
				3	16,371	24,504	18,189	21,972	31,767	29,895	27,827	23,167	31,865	19,263	23,715	26,435	28,280	29,298	33,785	32,601	26,918	26,123	33,549	22,989	30,182	23,756	21,779	26,468
		SSEA4	1	1	17,736	25,982	18,973	22,846	32,193	29,500	26,985	23,870	31,233	20,348	26,872	25,193	29,075	29,783	34,060	31,600	27,693	28,153	34,317	23,233	29,287	24,209	22,136	25,314
				2	17,217	25,976	18,532	22,316	32,416	29,718	27,301	23,442	31,416	20,235	26,595	24,686	28,859	29,691	34,936	33,714	27,526	27,920	33,238	23,078	28,948	23,873	21,881	25,383
				3	17,217	25,724	18,590	22,350	32,656	29,038	27,742	23,437	31,694	20,420	26,726	24,805	28,718	29,664	32,714	34,067	27,591	28,620	33,414	23,495	29,489	23,907	21,905	25,708
			2	1	17,898	26,956	20,009	23,708	34,366	31,277	27,394	23,732	31,177	20,963	27,393	24,998	28,663	31,202	34,728	32,443	28,435	29,092	33,655	24,214	29,476	25,003	22,360	26,335
				2	17,306	26,641	19,767	23,291	33,107	31,124	26,936	23,312	30,817	20,776	27,013	24,584	28,444	31,175	33,741	32,386	28,269	28,841	35,133	23,940	28,877	24,575	21,959	25,490
				3	17,525	27,087	19,976	23,418	32,856	30,818	26,924	23,508	31,257	21,278	26,998	24,750	28,489	31,065	34,631	32,894	28,251	29,254	33,988	23,991	29,091	24,762	22,032	25,451
			3	1	16,928	25,285	19,333	22,709	33,972	30,256	26,287	22,639	27,964	19,954	23,487	24,454	28,550	27,993	32,863	32,388	27,503	27,040	33,585	20,693	29,877	23,806	21,371	24,145
				2	16,415	25,313	18,674	22,084	32,386	28,966	25,718	22,327	27,655	19,764	23,059	23,877	28,348	27,927	32,966	31,483	27,225	26,381	33,143	20,635	29,571	23,617	21,214	24,008
				3	16,570	25,671	19,007	22,292	31,974	28,958	25,682	22,438	27,580	19,750	23,027	23,889	28,281	27,783	32,326	32,048	27,086	26,397	33,780	20,596	30,006	23,682	21,365	24,046
		SSEA1/SSEA4	1	1	16,964	24,596	18,392	21,687	32,182	29,577	27,890	22,658	32,034	19,682	25,726	24,973	27,605	29,850	32,540	34,154	27,464	28,014	33,281	24,551	27,883	23,276	20,966	26,457
				2	16,324	23,996	17,967	21,332	32,207	29,108	27,505	22,226	31,590	19,379	25,669	24,751	27,357	29,085	32,407	31,155	27,062	27,386	33,254	24,293	27,704	22,904	20,656	26,319
				3	16,541	24,136	17,893	21,538	32,069	29,300	27,630	22,202	31,446	19,363	25,718	24,684	27,164	28,967	32,680	32,342	27,349	27,770	33,451	24,256	27,951	23,014	20,737	26,203
			2	1	17,013	25,057	18,713	22,053	31,111	30,405	26,739	22,257	31,624	19,493	25,875	24,734	26,859	30,213	32,132	32,561	27,444	27,847	32,866	24,224	28,154	23,320	20,899	26,079
				2	16,523	25,096	18,372	21,775	31,815	29,995	26,466	21,878	32,025	19,277	25,605	24,046	26,696	30,293	32,469	33,482	26,841	27,435	33,160	24,082	27,412	23,111	20,746	26,060
				3	16,607	25,447	18,583	22,057	32,196	30,025	26,664	21,959	31,000	19,354	25,655	24,008	26,731	29,996	31,981	34,277	27,068	27,574	33,088	24,058	27,588	23,143	20,821	26,082
			3	1	16,495	24,634	18,427	22,161	34,892	29,767	27,024	22,412	31,463	19,298	22,719	25,837	27,730	28,978	32,810	32,241	27,118	26,282	33,476	22,351	28,667	23,210	20,990	26,100
				2	15,982	23,984	18,184	21,982	32,779	29,889	26,576	22,013	30,717	19,005	23,279	25,116	27,298	28,731	32,662	30,718	26,864	25,862	33,166	22,032	29,167	22,970	20,922	26,073
				3	UD	24,528	18,254	22,148	32,296	29,706	26,618	22,189	31,309	19,235	21,975	25,114	27,417	28,789	32,729	31,343	26,950	25,725	33,228	22,160	28,695	23,122	20,918	26,317
EMBRYO	ICM		1	1	21,690	26,575	22,622	24,307	23,381	34,234	36,293	23,995	25,141	24,341	29,910	27,010	32,390	32,117	32,558	28,267	31,726	30,846	29,559	32,527	23,621	26,395	22,968	33,145
				2	21,546	26,568	22,144	24,547	23,549	35,136	34,579	23,838	25,628	24,486	29,891	26,974	32,354	32,592	33,772	28,420	31,748	30,877	29,878	32,269	23,237	25,745	22,655	33,047
				3	21,637	25,976	22,202	24,513	23,563	34,840	39,810	23,918	26,322	24,605	29,745	26,670	32,329	32,771	33,972	28,133	32,120	30,858	30,660	32,333	23,764	26,104	22,810	33,100
			2	1	21,563	25,242	20,474	24,299	22,670	34,200	33,023	22,962	23,585	22,596	29,952	26,706	32,061	33,170	31,439	26,616	31,148	31,214	28,825	34,423	22,766	26,121	22,584	32,525
				2	20,920	25,567	20,442	24,110	22,129	35,293	32,664	22,589	23,238	22,433	29,441	26,340	32,112	32,980	31,350	26,374	31,029	30,454	28,605	33,219	22,340	25,919	22,408	32,134
				3	21,091	25,862	20,568	23,893	22,325	34,487	32,211	22,585	23,117	22,430	29,673	26,569	31,630	32,683	30,959	26,377	30,741	30,707	28,447	33,084	22,441	26,002	22,442	32,738
			3	1	21,057	26,306	21,461	24,391	22,516	34,853	32,001	23,003	23,779	22,765	30,243	26,464	32,366	32,893	31,556	26,341	32,576	30,901	28,727	32,607	23,322	26,407	22,777	32,456
				2	21,159	25,771	20,896	24,150	22,357	33,250	33,461	22,819	23,622	22,535	30,131	26,348	31,449	32,596	31,722	26,336	31,153	31,159	28,813	34,989	22,936	26,570	22,525	32,491
				3	20,835	25,228	19,982	24,082	22,289	34,690	33,197	22,857	23,556	22,557	30,720	26,377	31,404	33,211	31,188	26,274	31,307	30,891	28,524	33,015	23,437	26,686	22,708	32,564

UD: Undetermined (Ct>40)

2.2 La dérivation de lignées rbESC-LIF

2.2.1 Dérivation de lignées en absence de FGF

Afin d'obtenir des cellules naïves, j'ai essayé de dériver et de cultiver des ESCs de lapin dans les conditions de culture des mESCs, c'est-à-dire en présence de LIF. J'ai donc dérivé des lignées dans les mêmes conditions que les lignées de rbESC-FGF présentées précédemment, mais en remplaçant le FGF par du LIF. De plus, dans l'objectif d'accroître le taux de dérivation de lignées de rbESCs naïves, j'ai ajouté au milieu de dérivation deux molécules qui ont permis par ailleurs d'augmenter le taux de reprogrammation cellulaire chez la souris : le butyrate de sodium (ButNa) et le kenpaullone (KP). Le ButNa est un inhibiteur des histones déacétylases qui agit sur le remaniement de la chromatine et facilite ainsi le processus de reprogrammation des cellules différenciées en iPSCs (Huangfu et al., 2008). Cette molécule a permis de convertir des cellules EpiSC dépendantes du FGF2 en cellules plus immatures capables de coloniser un blastocyste de souris (Ware et al., 2009). Le kenpaullone est un inhibiteur de la GSK3β et du complexe CDK1/CyclinB, capable de remplacer le facteur KLF4 lors de la reprogrammation de cellules différenciées en iPSCs (Lyssiotis et al., 2009).

J'ai donc placé en culture des ICMs de lapin sur des MEF traités à la mitomycine dans le milieu DMEM/F12 (Honda et al., 2008; Osteil et al., 2013). 20 ICMs ont été cultivés en absence de tout facteur de croissance ou d'inhibiteur (contrôle négatif), 20 en présence de FGF2 (contrôle positif), 36 avec du LIF (1000U/ml), 36 avec du ButNa (Sigma-Aldrich B5887, 0,1mM), 38 avec du LIF et du ButNa, 16 en présence KP (Sigma K3888, 0,5µM) et autant avec du LIF et du KP. Contre toute attente, les ICMs ont été capables de se développer dans le milieu de culture sans aucun facteur de croissance ou d'inhibiteur, et des cellules de type rbESC ont pu être maintenues ainsi en culture pendant 4 passages. Comme prévu, les dérivations réalisées en présence de FGF2 ont abouti à l'obtention de 6 nouvelles lignées de rbESCs que nous avons conservées en culture jusqu'au sixième passage. En revanche, l'ajout de ButNa ou de KP n'a pas permis d'améliorer la survie et le développement des cellules de type rbESC, puisqu'aucune culture n'a pu être maintenue au-delà du quatrième passage, même si le ButNa ou le KP étaient associés au LIF. En revanche, la culture en présence de LIF a permis d'établir deux lignées (10% de taux de dérivation) de rbESC, nommées rbES-LIF1 et rbES-LIF2 (Figure 22a – au dos).

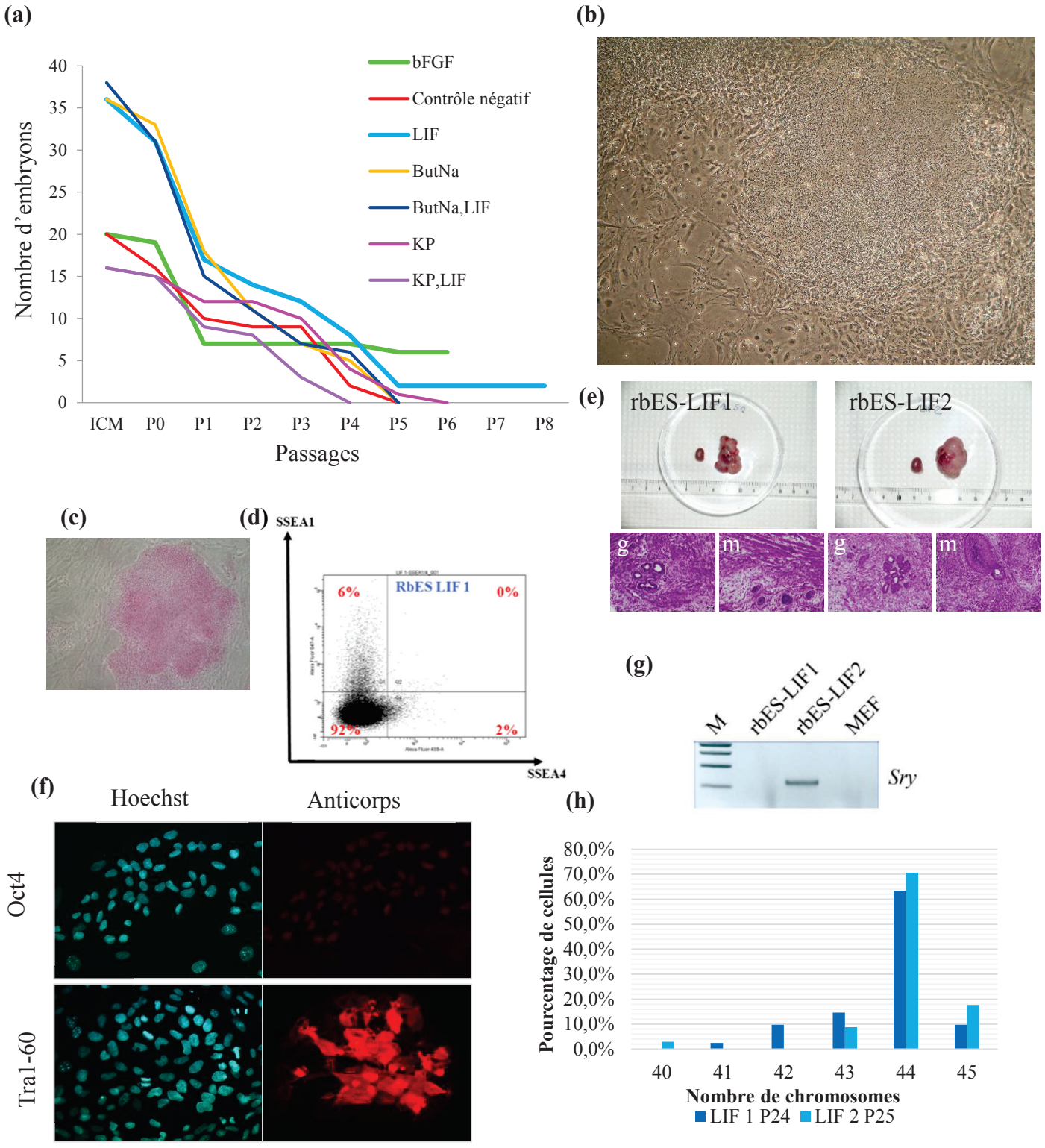


Figure 22: Caractérisation des lignées rbES-LIF1 et 2

(a) Courbe de dérivation dans 8 conditions différentes (bFGF comme contrôle positif)
(b) Morhologie de la lignée rbES-LIF1
(c) Révélation de l'activité phosphatse alcaline de la lignée rbES-LIF1
(d) Analyse de l'expression de SSEA1 et SSEA4 par cytométrie en flux sur la lignée rbES-LIF1
(e) Tératomes de la lignée rbES-LIF1 (à gauche) et rbES-LIF2 (à droite) après coloration HPS (Hemalun, Phloxin, Safran) révélant des glandes (endoderme « g ») et du muscle (mésoderme « m »)
(f) Révélation des protéines OCT4 et TRA1-60 par immunomarquage sur la lignée rbES-LIF1
(g) Révélation par PCR génomique de *Sry* M : Marqueur, MEF : témoin négatif
(h) Caryotype des deux lignées. Histogramme de la répartition des cellules (en pourcentage) en fonction du nombre de chromosome dénombré.

2.2.2 Caractérisation des lignées rbESC-LIF

Ces deux lignées ont été caractérisées. Elles présentent une morphologie de cellule pluripotente proche des rbESC-FGF et forment des colonies plates (Figure 22b). Elles expriment la phosphatase alcaline, le gène *Oct4* et le marqueur de surface Tra1-60 comme les rbiPSC-FGF, mais peu le marqueur SSEA1 (environ 6% de cellules SSEA1+) et pas le marqueur SSEA4 (Figure 22c, d et f). Elles sont euploïdes et de sexe différents (rbES-LIF1 44XX ; rbES-LIF2 44XY) (Figure 22g et h). Elles sont capables de se différencier dans les trois feuillets embryonnaires lors de la production de tératomes (Figure 22e). Ces deux lignées de rbESC-LIF présentent donc bien les caractéristiques de PSCs, bien que leur croissance soit plus lente et qu'elles aient tendance à se différencier beaucoup plus vite et facilement que les rbESC-FGF.

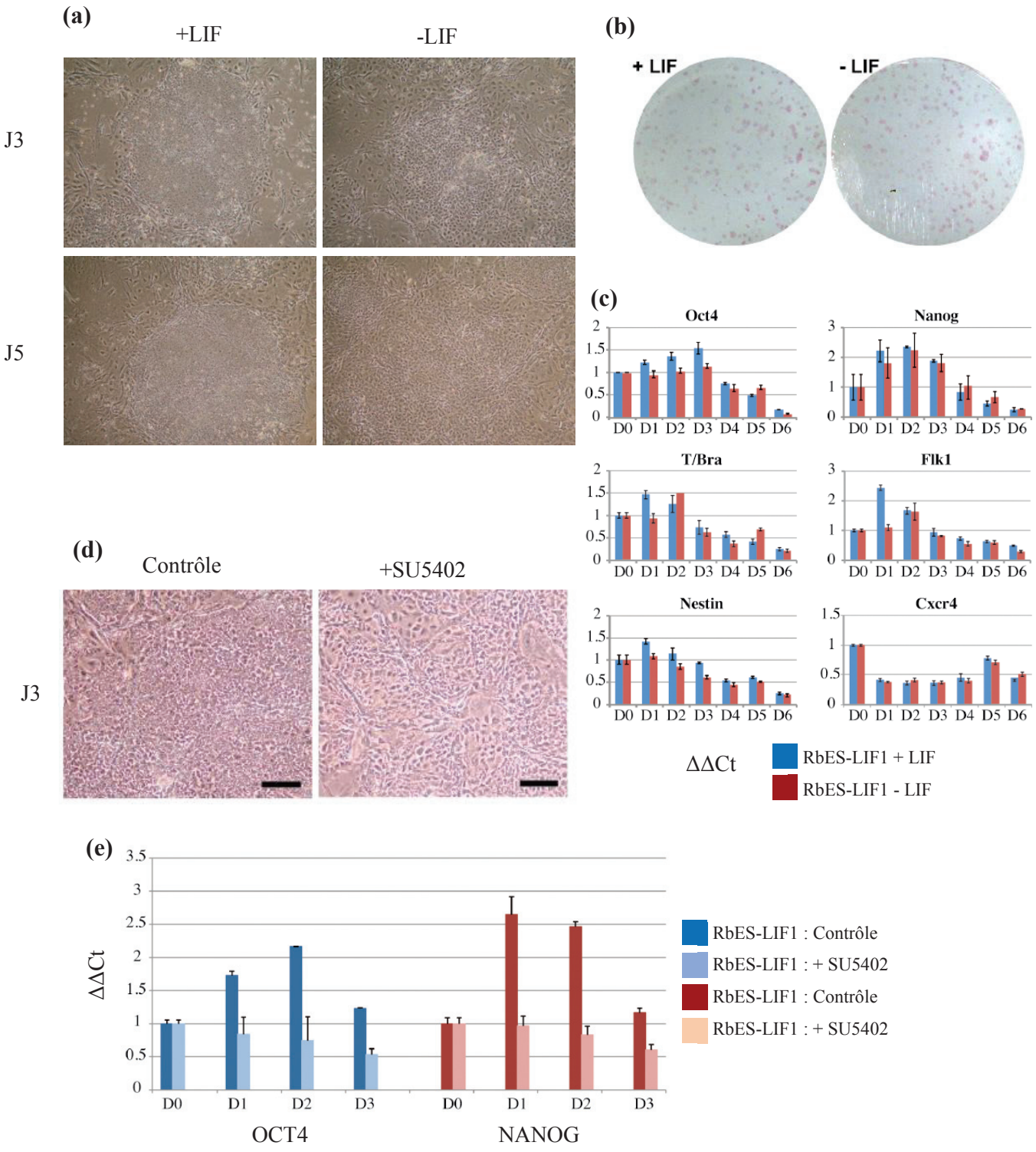


Figure 23: Voies de signalisations impliquées dans le maintien des rbESC-LIF

(a) Morphologie de la lignée rbES-LIF1 après privation de LIF pendant 3 jours et 5 jours
(b) Révélation de l'activité phosphatase alcaline de la lignée rbES-LIF1 après 4 jours de culture avec ou sans LIF.
(c) Analyse par RT-qPCR de l'expression de gènes de pluripotence (*Oct4* et *Nanog*) et de différenciation (*T/Bra, Flk1, Nestin* et *Cxcr4*) lors de privation de LIF
(d) Morphologie de la lignée rbES-LIF1 après ajout de SU5402 pendant 3 jours
(e) Analyse de l'expression de gène de pluripotence *Oct4* et *Nanog* après ajout de SU5402

J'ai ensuite étudié le rôle du LIF dans le maintien de la pluripotence de ces cellules. Lors de culture en absence de LIF, les cellules ne se différencient pas et ne perdent pas leur activité phosphatase alcaline (Figure 23a et b). De même l'expression des gènes de pluripotence *Oct4* et *Nanog*, ainsi que des gènes de différenciation *T-Bra, Flk1, Nestin* et *Cxcr4* analysée par RT-qPCR, varie de façon similaire durant 6 jours de culture en présence ou absence de LIF (Figure 23c). Au contraire, lorsqu'on ajoute un inhibiteur du récepteur au FGF dans les cultures (SU5402 à 10µM), les cellules se différencient rapidement et on observe une forte diminution de l'expression des gènes *Oct4* et *Nanog* (Figure 23d et e). Ces résultats indiquent que les lignées rbESC-LIF ne sont pas dépendantes du LIF, mais sont dépendantes du FGF pour se maintenir dans un état indifférencié en culture. Dans ce cas, on peut supposer que le FGF nécessaire à l'autorenouvellement est produit soit par les cellules nourricières, soit de façon autocrine par les cellules elles-mêmes. Cela explique sans doute l'instabilité de ces cellules qui sont dans un environnement pauvre en facteur de croissance, nécessaire au maintien de l'état indifférencié.

2.3 Comparaison moléculaire des lignées rbESC-FGF, rbiPSC-FGF, et rbESC-LIF

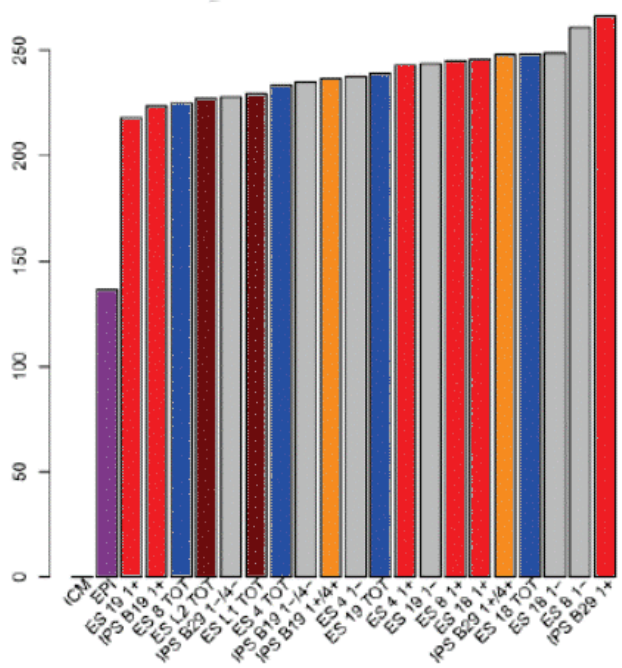
La production de ces différentes lignées de rbPSCs entre dans un programme ANR franco-hongrois, appelé Plurabbit, coordonné par P. Savatier, dont le but était de dériver et de caractériser des PSCs capables de produire des animaux chimères chez le lapin. Trois équipes en plus de la nôtre ont participé à ce programme : (*i*) l'équipe de V. Duranthon de l'INRA de Jouy-en-Josas était chargée d'analyser le transcriptome complet des lignées et de le comparer à celui de l'ICM, par la technique de microarray sur puce Agilent® (monocouleur) ; (*ii*) le groupe de S. Bösze, de l'ABC (Agricultural Biotechnology Center) à Gödöllö en Hongrie, a étudié l'expression des microARNs de ces cellules en comparaison toujours à celle des cellules de l'ICM ; et (*iii*) le laboratoire d'A. Dinnyes, du SIU (Szent Istvan University) à Gödöllö en Hongrie, a cloné et séquencé les gènes de pluripotence du lapin. Dans notre laboratoire, en plus de la dérivation et de la caractérisation de nos lignées, nous avons également comparé l'expression de gènes de pluripotence par RT-qPCR dans les trois types de lignées obtenues. Dans l'article présenté précédemment, je n'ai montré que les résultats concernant les lignées de rbPSC-FGF mais pas ceux des lignées rbESC-LIF. Je présenterai donc ces derniers résultats dans le paragraphe 5.3, en même temps que les données obtenues sur de nouvelles lignées, les rbESC-ALF. Ce projet Plurabbit a permis de mettre en place une collaboration européenne étroite qui permettra d'obtenir, dans un futur très proche, de précieuses données sur la régulation de la pluripotence chez le lapin [(Tancos et al., 2012) – Annexes p197].

Les échantillons analysés dans les trois laboratoires (Jouy-en-Josas pour le transcriptome, Gödöllö pour le miRnome et Lyon pour les l'expression des gènes de pluripotence) ont été produits en même temps en triant les sous-populations SSEA1+/4+, SSEA1+/4-, SSEA1-/4+ et SSEA1-/4- des différentes lignées de rbESC-FGF (rbES-4, rbES-8, rbES-18 et rbES-19), de rbiPSC-FGF (rbiPS-B19, rbiPS-B24 et rbiPS-B29) et de rbESC-LIF (rbES-LIF1 et rbES-LIF2). Nous avons réalisé 3 réplicats biologiques en triant trois fois les sous-populations de chaque lignée. Pour chaque tri cellulaire, nous avons séparé chaque sous-population en trois 3 échantillons donnés aux 3 différents laboratoires. Les échantillons analysés dans chaque laboratoire sont donc les mêmes que ceux utilisés pour les analyses de RT-qPCR présentées précédemment (Osteil et al., 2013). Les RT-qPCR effectuées dans notre équipe sont donc utilisables pour valider les résultats obtenus sur les puces Agilent. Nous avons déjà présenté des observations montrant que les rbiPSCs SSEA1+ et SSEA1+/4+ sont les cellules qui présentent les caractéristiques naïves les plus marquées. Nous avons donc vérifié cette conclusion en analysant le transcriptome global et les clusters de microARNs des différentes lignées.

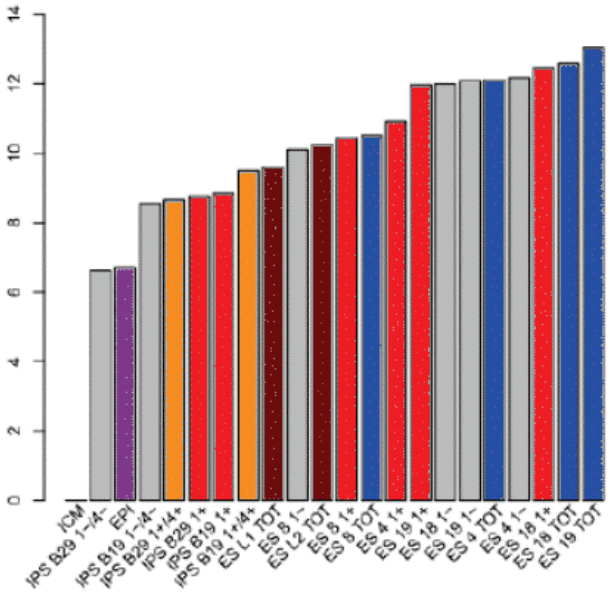
(a)

Gènes	DPPA2	OOEP	NANOG	KLF12	KHDC1	KLF4	TBX3	GATA6
Ratio	33	29	24	21	14	12	7	6
Gènes	**KLF5**	**DPPA5**	**DPPA3**	**TET2**	**IL6ST**	**ESRRB**	**TET1**	**DAZL**
Ratio	6	6	5	5	5	3	3	2

(b)



(c)



EPI
TOTAL
SSEA1+
SSEA1+/SSEA4+
SSEA1-/SSEA4-

Figure 24: Analyse du transcritpome des rbPSC et de l'embryon de lapin sur puces Agilent (1)

(a) Gènes surexprimés dans les cellules de l'ICM et par rapport aux cellules de l'EPI
(b) Distances euclidiennes des rbPSCs par rapport à celles de l'ICM et de l'EPI
(c) Distances euclidiennes des rbPSCs par rapport à celles de l'ICM et de l'EPI basées sur 11 gènes de pluripotence communs aux puces et aux analyses en qRT-PCR

2.3.1 Analyses des transcriptome sur puces Agilent

L'équipe de V. Duranthon s'intéresse au développement précoce de l'embryon de lapin et à l'activation du génome embryonnaire. Pour étudier le transcriptome des embryons de lapin, elle a créé une puce dédiée à cette analyse en complétant la puce commerciale lapin Agilent (G2519F) avec des ESTs (Expressed Sequence Tag) provenant de 4 banques de cDNA soustractives entre différents stades embryonnaires et des gènes associés à la pluripotence et au développement embryonnaire définis avec le logiciel Ensembl Genome Browser (oryCun2.0) (Léandri et al., 2009). À l'aide de ces puces, cette équipe a ensuite comparé le transcriptome global de 4 tissus embryonnaires : l'ICM et le trophectoderme isolés au stade blastocyste (4 jours post-fécondation) l'épiblaste et l'hypoblaste disséqués au stade disque embryonnaire (6 jours post-fécondation). Nous ne nous intéresserons ici qu'aux comparaisons entre ICM et épiblaste qui correspondent chez la souris aux stades de dérivation des cellules naïves et amorcées, afin de définir les gènes les plus exprimés dans l'ICM par rapport à l'épiblaste chez le lapin. Cette analyse permet de cibler les gènes qui représentent l'état naïf de pluripotence chez le lapin. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 24a, les gènes les plus surexprimés dans l'ICM de lapin par rapport à l'épiblaste sont *Dppa2, Dppa5, Dppa3 (Stella), Tbx3, Klf4, Klf5, Ep300, Tet1, Tet2, Gtr3, Dazl, Il6st, Esrrb, Klf12, Khdc1 et Ooep*. L'expression forte et conjointe de ces gènes est probablement représentative de l'état naïf à atteindre lors de dérivation de PSCs de lapin.

L'équipe de V. Duranthon a ensuite comparé les transcriptomes des différentes sous-populations des rbESC-FGF, rbESC-LIF et rbiPSC-FGF. Cette analyse globale confirme nos résultats obtenus par RT-qPCR sur l'expression de 22 gènes de pluripotence, et montre une séparation nette des rbESCs et des rbiPSCs quelles que soient les sous-populations SSEA1+ ou SSEA1- considérées [Figures n°6A et 6B p95 (Osteil et al., 2013)]. La comparaison des distances euclidiennes obtenues à partir du transcriptome global entre les différentes sous-populations de rbPSCs, les cellules de l'ICM et celles de l'épiblaste, montre l'absence de différence entre les rbESCs et les rbiPSCs, en comparaison de leur variation par rapport aux cellules de l'ICM ou de l'épiblaste (Figure 24b). En revanche, lorsqu'on sélectionne les résultats obtenus pour 11 gènes présents sur la puce et analysés en RT-qPCR dans notre laboratoire, à savoir *Oct4, Nanog, Dazl, Fbxo15, Gbx2, Cldn6, Cdx2, Tbx3, Pitx2, Otx2* et *Klf4*, on retrouve alors la ségrégation entre rbESCs et rbiPSCs constatée précédemment [Figures n°6 p95 (Osteil et al., 2013)], avec une distance plus faible entre rbiPSCs et ICM (Figure 24c). On observe également qu'il n'y a pas de ségrégation selon l'expression du marqueur SSEA1 mais

(a)

rbESC / rbICM

Gènes de l'état naïf de pluripotence (mESC)			Gènes de l'état amorcé de pluripotence (mEpiSC)	
CD9	ESRRB	REX1	CDX2	T
CDH1	GDF3	IL6ST	FGFR1	WNT3
DAZL	HHEX	KDM4C	FST	WNT5A
DNMT3B	KLF5	KDM6A	GRB2	FOXJ3
DPPA2	NR5A2	KLF12	ISL2	FOXK2
DPPA3	SALL4	KLF17	LEFTY1	FOXL2
DPPA4	TBX3	KLF4	NES	FOXN2
DPPA5	TET1		PAX6	FOXP1
EP300	TET2			

Surexprimés dans les cellules de l'ICM
Surexprimés dans les cellules rbES

(b)

rbiPSC / rbICM

Gènes de l'état naïf de pluripotence (mESC)			Gènes de l'état amorcé de pluripotence (mEpiSC)	
CD9	DPPA2	SALL4	PITX2	VASA
GS3KB	DPPA3	TBX3	PITX3	GATA2/3/6
DNMT1	DPPA4	TET1	BMP4	MAEL
KDM1A	DPPA5	TET2	GRB2	NEUROD2
KDM6A	ESRRB	REX1	CER1	NOBOX
KDM3A	GDF3	IL6ST	CITED1	SOX5/6/17
	HHEX	KDMAC	NES	STRA8
	DAZL	RIF1	T	SYCP1
	NR5A2	KLF12		
	PRMT6	KLF17		

Surexprimés dans les cellules de l'ICM
Surexprimés dans les cellules rbiPS

(c)

rbESC / rbiPSC

Gènes de l'état naïf de pluripotence (mESC)

Ratio > 2 ou < 0,5

rbiPSC > rbESC

Gène	Ratio
Oct4	0,2
Nanog	0,09
T	0,3
KLF4	0,08
KLF5	0,3
CDH1	0,4
DPPA2	0,2
KDM6A	0,4
DNMT3B	0,1

rbiPSC < rbESC

Gène	Ratio
Dax1	2

Gènes de l'état amorcé de pluripotence (mEpiSC)

Ratio > 2 ou < 0,5

rbiPSC > rbESC

Gène	Ratio
CER1	0,2
EOMES	0,3
FOXA2	0,3
GATA6	0,4
WNT4	0,3
OTX2	0,3
NODAL	0,3

rbiPSC < rbESC

Gène	Ratio
CDH2	11
GBX2	3
PAX3	29
PAX6	164
SOX11	3
SOX2	2,5

Figure 25: Analyse du transcriptome des rbPSC et de l'embryon de lapin sur puces Agilent (2)

(a) Gènes différentiellement exprimés entre les rbESCs et les cellules de l'ICM
(b) Gènes différentiellement exprimés entre les rbiPSCs et les cellules de l'ICM
(c) Gènes différentiellement exprimés entre les rbESCs et les rbiPSCs. A gauche les gènes caractéristiques de l'état naïf de pluripotence, à droite les gènes caractéristiques de l'état amorcé.

plutôt par type de lignée, et que les lignées rbESC-LIF se situent entre les deux types de PSC-FGF. Donc les rbiPSCs présentent un transcriptome similaire à celui de l'épiblaste et plus proche de celui de l'ICM que celui des rbESC-LIF et des rbESC-FGF, les différences observées entre les deux types de rbESC étant minimes.

Ces analyses ont permis de définir les gènes surexprimés ou sous-exprimés dans les rbESCs (rbESC-FGF et rbESC-LIF regroupées) par rapport à l'ICM (Figure 25a). La majorité des gènes de pluripotence naïfs définis chez la souris et confirmés chez le lapin sont surexprimés dans l'ICM par rapport aux rbESCs, contrairement aux gènes de pluripotence associés à l'état amorcé (Figure 25a). Les rbESCs peuvent donc être qualifiées de cellules amorcées. En revanche, la même analyse appliquée aux rbiPSCs aboutit à une conclusion différente (Figure 25b). En effet, il apparait que certains gènes de pluripotence naïfs, comme *Dppa5* (Amano et al., 2006) et *Dppa2* (Du et al., 2010), sont plus exprimés dans les rbiPSCs que dans l'ICM. A l'inverse, certains gènes de l'état amorcé, comme *T* ou *NES*, sont plus exprimés dans les cellules de l'ICM que dans les rbiPSCs. Ces résultats montrent que les rbiPSC-FGF sont stabilisées dans un état intermédiaire entre les états naïf et amorcé.

Enfin, la Figure 25c présente les différences d'expression, supérieures à un facteur 2 ou inférieures à un facteur 0,5, des gènes marqueurs des états naïf et amorcé entre les rbESCs et les rbiPSCs. Nous pouvons voir que les rbiPSCs expriment une majorité de gènes représentatifs de l'état naïf plus fortement que les rbESCs. En revanche, les rbESCs n'expriment pas plus de marqueurs amorcés que les rbiPSC. Ce résultat renforce la conclusion que les rbiPSCs ont un transcriptome plus proche de celui des cellules de l'ICM que les rbESCs, et sont donc plus proche de l'état naïf de pluripotence.

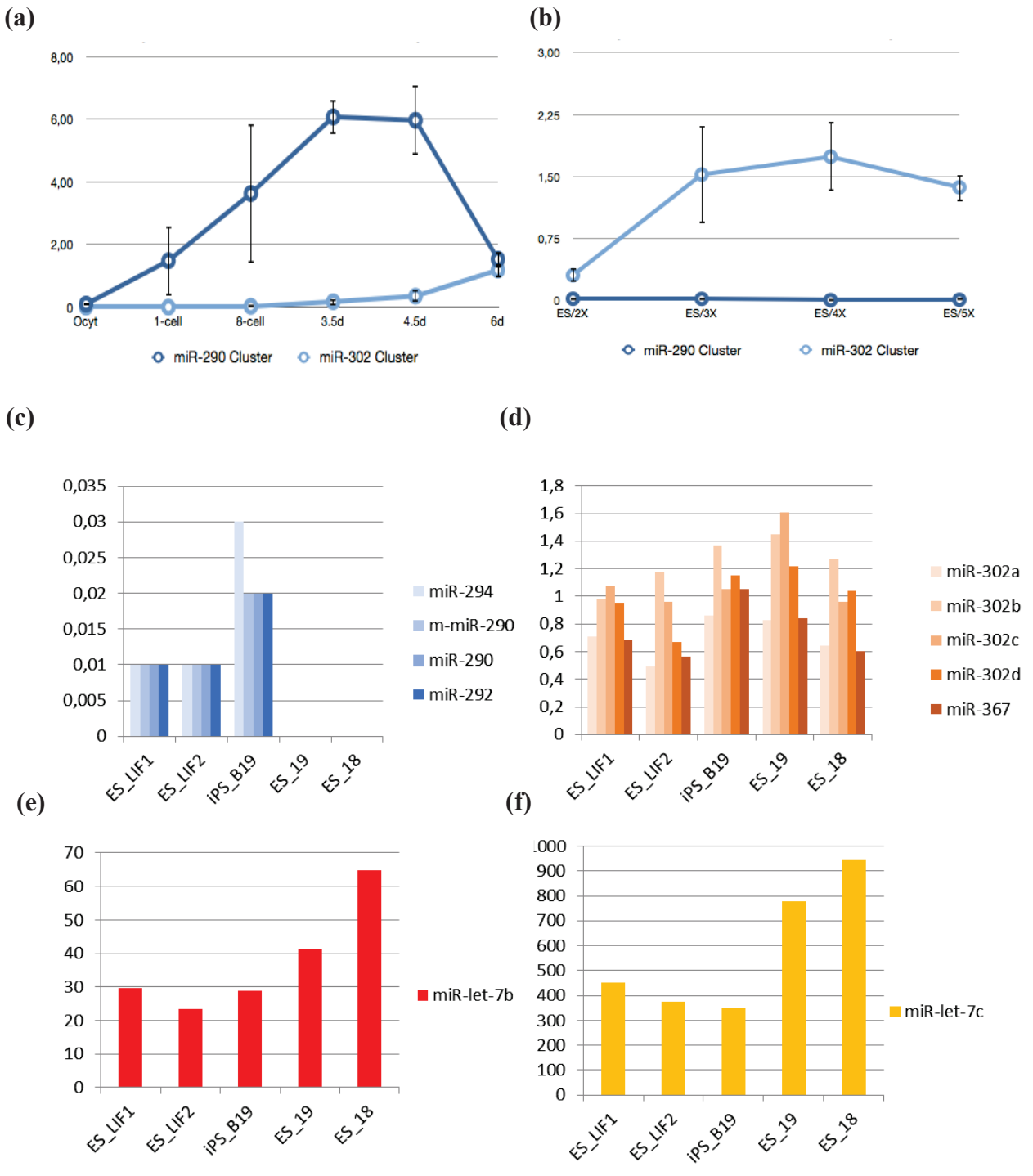


Figure 26: Analyse de l'expression des clusters de miARNs des rbPSCs et des embryons de lapin (ΔΔCt)

(a) Expression des clusters miR-290 et miR-302 dans l'embryons de lapins
(b) Expression des clusters miR-290 et miR-302 lors des premiers passages cellulaires (X) d'une dérivation de rbESCs
(c) Expression du cluster miR-290 dans les différentes rbPSCs
(d) Expression du cluster miR-302 dans les différentes rbPSCs
(e) Expression du cluster miR-Let7b dans les différentes rbPSCs
(f) Expression du cluster miR-Let7c dans les différentes rbPSCs

2.3.2 Les microARN

L'équipe de S. Bösze s'intéresse au rôle des microARNs dans le développement embryonnaire précoce et les PSCs chez le lapin. Cette équipe a recherché les clusters de microARN reliés à la pluripotence chez le lapin et a mis en évidence l'expression de deux clusters, miR-290 et miR-302, dans l'embryon de lapin durant les 6 premiers jours de développement (Maraghechi et al., 2013). Le cluster miR-290, qui est associé à l'état naïf de pluripotence chez la souris, est exprimé à partir du stade 1-cellule et correspond alors au pool d'ARNs maternels (Figure 26a). Son expression augmente ensuite au stade 8-cellules, lors de l'activation du génome embryonnaire, jusqu'à atteindre un maximum au jour 3,5 dpc (stade blastocyste). L'expression diminue à partir du jour 6 dpc (stade disque embryonnaire). C'est seulement à ce moment-là que le cluster miR-302, qui est associé à l'état amorcé de pluripotence, commence à être exprimé. De même, lors des premiers passages d'une dérivation de rbESC, seule l'expression du cluster miR-302 est détectée à partir du 3ème passage (Figure 26b). Les deux clusters miR-290 et miR-302 semblent donc être associés chez le lapin aux mêmes états de pluripotence que chez la souris.

Lors de l'analyse de l'expression des différents clusters de microARN dans les différentes sous-populations de rbESC et de rbiPSC triées selon les marqueurs SSEA1 et SSEA4, aucune variation n'a pu être mise en évidence entre les différentes sous-populations au sein d'un même type cellulaire (Figure 26c à f). En revanche, des différences notables entre types de lignée ont été observées pour les clusters miR-290 et miR-let-7, mais pas pour le cluster miR-302. En effet l'expression de 5 membres du cluster miR-302 (miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367) est similaire entre les trois types de cellules, rbESC-FGF, rbESC-LIF et rbiPSC-FGF (Figure 26d). A l'inverse, l'expression des 4 membres cluster miR-290 (miR-294, m-miR-290, miR-290, miR-292) n'est pas détectée dans les rbESC-FGF et est observée seulement à un très faible niveau dans les rbESC-LIF et les rbiPSC-FGF (Figure 26c). Enfin, 2 membres du cluster Let7 impliqué dans la différenciation (miR-Let-7b et miR-Let-7c) sont exprimés plus fortement dans les rbESC-FGF que dans les cellules rbiPSC-FGF et rbESC-LIF (Figure 26e et f). Une nouvelle fois, ces analyses confirment que les lignées de rbiPSC-FGF sont plus proches de l'état naïf de pluripotence que les lignées de rbESC-FGF. Les lignées de rbESC-LIF semblent se situer à un niveau intermédiaire entre les deux types de rbPSC-FGF.

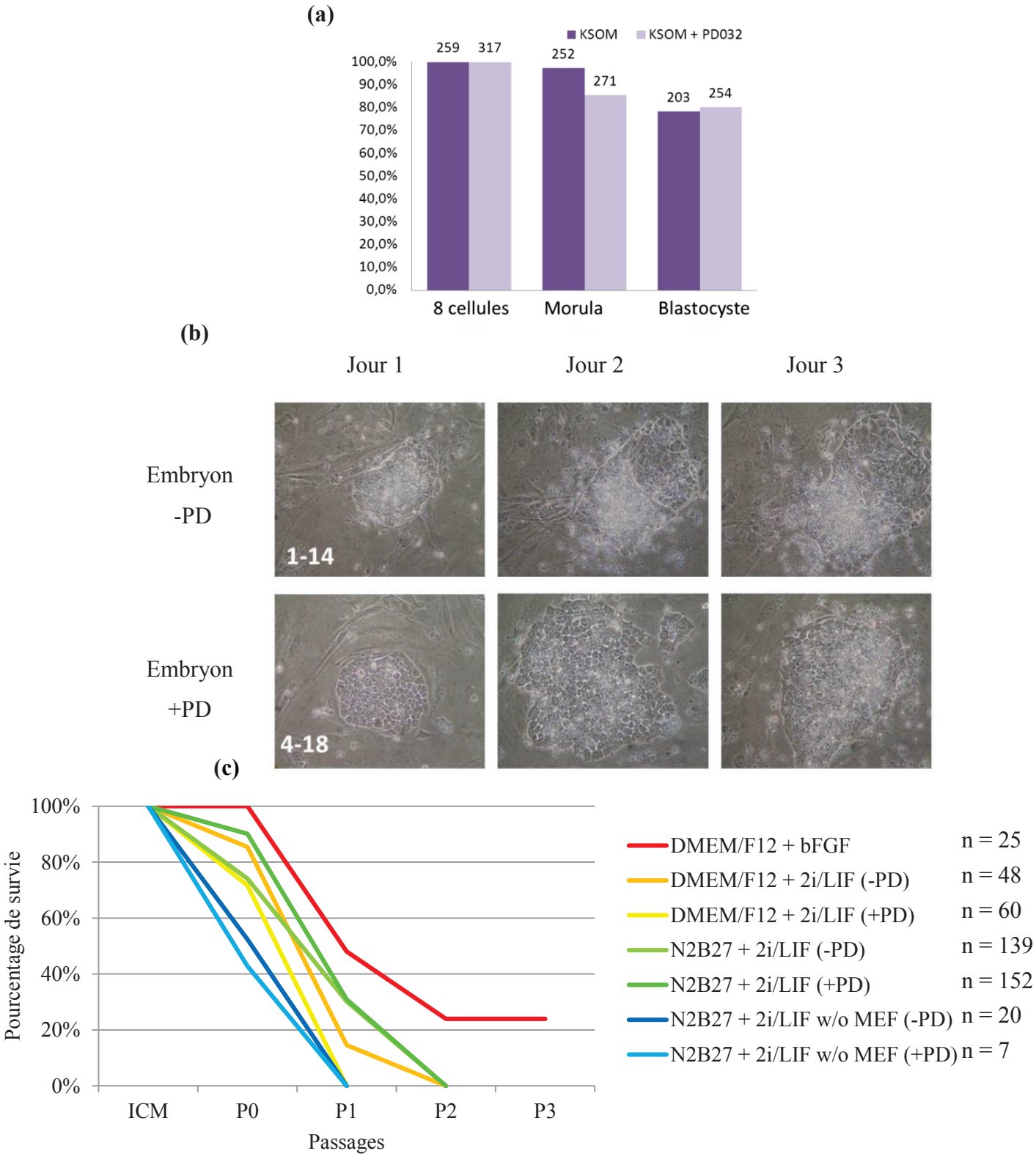


Figure 27: Dérivation de lignée en condition 2i/LIF

(a) Culture des embryons dans le milieu KSOM en présence ou en absence de PD032
(b) Photos de cellules lors des 3 premiers jours de dérivation, pour un embryon cultivé en – PD et en +PD
(c) Courbe de dérivation des ICM dans les différentes conditions. La condition DMEM/F12 + bFGF est le témoin positif de dérivation.

2.4 La dérivation de lignées en condition 2i/LIF

L'utilisation du milieu 2i/LIF, c'est-à-dire de milieu N2B27 supplémenté avec un inhibiteur de la voie des MAPKs (PD0325901, 1µM), un inhibiteur de la GSK3β (CHIR099021, 3µM) et du LIF (1000U/ml), a permis d'obtenir des cellules ES avec des souches de souris résistantes à la dérivation (Ying et al., 2008) et chez le rat (Buehr et al., 2008). En effet, pour des raisons inconnues liées peut-être à une sensibilité différente des cellules de l'ICM, il s'est avéré impossible d'établir des lignées d'ESCs en présence de sérum et de LIF. Dans l'hypothèse où le même phénomène puisse se produire avec l'espèce lapin, j'ai tenté de dériver des lignées de rbESCs en condition 2i/LIF. Dans ce but, 576 embryons prélevés au stade 8-cellules ont été divisés en deux groupes et cultivés jusqu'au stade blastocyste en présence (317 embryons) ou non (259 embryons) de PD0325901 dans deux milieux différents. L'objectif était de favoriser l'expression de *Nanog* dans les cellules de l'ICM ainsi que le nombre total de cellule de l'ICM, comme cela a été observé chez les embryons murins et humains (Van der Jeught et al., 2013; Nichols et al., 2009). Aucune différence n'a été observée dans le taux de développement embryonnaire en présence ou non d'inhibiteur (respectivement 254 blastocystes (80%) et 203 blastocystes (78%) –Figure 27a), ni dans la taille des ICMs. L'effet du PD0325901 n'a pas été analysé précisément au niveau du nombre et de l'expression de *Nanog* des cellules des ICMs, car ces derniers ont tous été disséqués et mis en culture. Les ICMs obtenus à partir des deux lots d'embryon ont été ensemencés selon 3 conditions différentes en faisant varier le support (MEF traités à la mitomycine ou fibronectine) et le milieu de culture (DMEM/F12 + 20% KO-SR + 2i/LIF ou N2B27 + 2i/LIF). En plus du groupe de 25 ICMs témoins positifs cultivés dans les conditions habituelles en présence de FGF2, 6 groupes ont été comparés : 48 ICMs issus des embryons cultivés sans PD0325901 (-PD) et 60 ICMs issus des embryons cultivés avec du PD0325901 (+PD) ont été placés sur MEF en milieu DMEM/F12 + 2i/LIF ; 139 ICMs (-PD) et 152 ICMs (+PD) ont été placés sur MEF en milieu N2B27 + 2i/LIF ; 20 ICMs (-PD) et 7 ICMs (+PD) ont été placés sur fibronectine en milieu N2B27 + 2i/LIF.

Après dissection et ensemencement, 80% des ICMs ont adhérés sur les MEF comme sur la fibronectine quel que soit le milieu utilisé (passage 0). Contrairement aux ICMs témoins ensemencés en présence de FGF2, la morphologie des cellules en présence de 2i/LIF était plus proche de celle des mESCs : elles étaient plus petites, plus sombres et formaient des colonies moins plate et plutôt en dôme (Figure 27b). Cependant, malgré leur morphologie prometteuse, il s'est avéré impossible de stabiliser ces cellules quel que soit le milieu car, après seulement deux jours de développement elles sont rentrées en apoptose. Au troisième jour de culture, la

majorité des ICMs en présence de 2i/LIF ont été éliminés sans même avoir effectué de passages cellulaires (Figure 27c), alors qu'il a été possible d'établir 6 nouvelles lignées dans les conditions témoins en présence de FGF2, avec un taux de dérivation habituel de 24%. Il faut noter qu'aucun ICM ne s'est développé sur la fibronectine et il apparaît très difficile de dériver de nouvelles lignées en absence de MEF. En effet les ICMs semblent en avoir besoin pour se fixer et se développer. Du fait du nombre important d'embryons utilisés pour cette expérience, il est possible de conclure que l'utilisation de milieu 2i/LIF ne permet pas de stabiliser les cellules d'ICM de lapin *in vitro* et de dériver des lignées de rbESCs.

2.5 Dérivation de lignée par passage unicellulaire

2.5.1 Adaptations des lignées rbESC-LIF

L'amplification des lignées de rbESC-FGF et de rbESC-LIF est réalisée par dissociation cellulaire en amas. Le fait de ne pas dissocier complètement les cellules évite la différenciation cellulaire, mais aussi empêche peut-être des cellules présentant potentiellement des propriétés plus naïves de prendre l'avantage en culture sur les cellules plus amorcées. Nous avons vu précédemment que les lignées de rbESC-LIF possèdent un transcriptome et un miRnome intermédiaire entre les rbiPSC-FGF plus naïves et les rbESC-FGF plus amorcées. J'ai donc testé la capacité des deux lignées de rbESC-LIF à résister au passage en suspension unicellulaire, dans le but d'isoler de rares cellules capables de se stabiliser à l'état naïf. Dans ce but, j'ai utilisé de l'Accutase®, un cocktail d'enzymes protéolytiques et collagènolytiques issues de crustacés, qui est moins stringent et souvent mieux toléré par les cellules que la trypsine. Parallèlement à ce traitement enzymatique, j'ai testé sur les mêmes cellules 2 milieux différents, le DMEM/F12 et le GMEM (le milieu de base des mESCs), et 2 types de sérum, le KO-SR et le FBS. Pour adapter progressivement les cellules à ces nouvelles conditions de culture, j'ai utilisé un plan d'expérience en deux parties : une première partie réalisée dans le milieu DMEN/F12 habituel et visant à remplacer progressivement le KO-SR par du FBS (20% KO-SR / 0% FBS, puis au passage suivant 15% KO-SR /5% FBS, pour terminer à 10% KO-SR / 10% FBS) ; la seconde partie a consisté à remplacer progressivement le milieu DMEM/F12 par du milieu GMEM en augmentant le pourcentage de milieu GMEM (25%, 50%, 75% et enfin 100%).

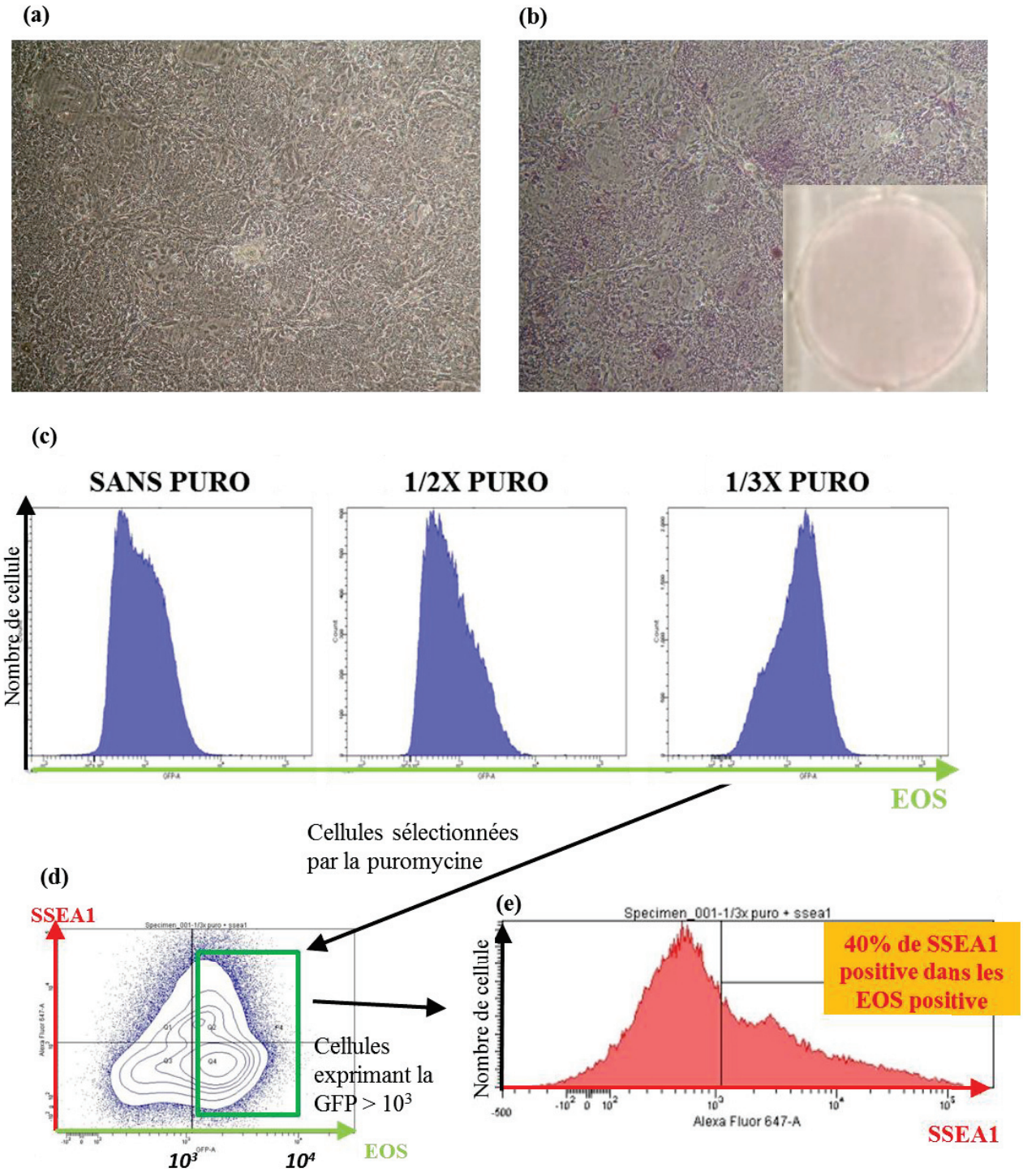


Figure 28: Les cellules rbES-ALF1 et 2

(a) Morphologie de la ligné rbES-ALF2
(b) Révélation de l'activité phosphatase alcaline de la lignée rbES-ALF2
(c) Histogramme de l'analyse de la fluorescence de la GFP sur la lignée rbES-ALF1 sans sélection (gauche), sélectionnée à 0,5µg/mL de puromycine (centre) et 0,3µg/mL de puromycine (droite)
(d) DotPlot des cellules rbES-ALF1 sélectionnée à 0,3µg/mL de puromycine, selon l'expression d'EOS (abscisse) et de SSEA1 (ordonnée).
(e) Histogramme montrant la proportion des rbES-ALF1 exprimant SSEA1 parmi les cellules exprimant la GFP à un niveau de fluorescence supérieur à 10^3 (Cadre vert de la figure (d)).

J'ai finalement réussi à stabiliser les deux lignées de rbESC-LIF en culture unicellulaire dans le milieu DMEM/F12 supplémenté par 10% de KO-SR, 10% de FBS et 1000U/ml de LIF. Ces deux lignées ont été renommées rbES-ALF1 et -ALF2 (pour Accutase, LIF et FBS), afin de les distinguer des lignées d'origine maintenues en culture avec uniquement du KO-SR et par repiquage manuel. En revanche, leur culture dans un milieu basé sur du GMEM ou ne contenant que du FBS entraine leur différenciation. La morphologie des cellules de ces deux nouvelles lignées n'est pas différente de la morphologie des cellules d'origine ; mais les colonies plates sont plus régulières, les cellules sont plus homogènes et la proportion de cellules différenciées est quasi nulle (Figure 28a).Elles expriment la phosphatase alcaline (Figure 28b). J'ai ensuite infecté ces cellules avec le vecteur lentiviral EOS, afin d'analyser l'activité de l'enhancer distal du promoteur de *mOct4*. Le taux de cellules infectées exprimant la GFP peut atteindre 50% et, contrairement aux rbESC-FGF, il est possible de sélectionner ces cellules avec de la puromycine à 0.3µg/ml, soit une quantité dilué au 1/3 par rapport à la dose utilisée pour les rbiPSCs infectées par le lentivecteur EOS (Figure 28c). Les cellules EOS positives expriment plus fortement le marqueur de surface SSEA1 que les cellules non infectées (40% contre X%) (Figure 28d et e). Ces résultats montrent que les lignées rbESC-ALF1 et 2 présentent deux caractéristiques de cellules naïves, l'activité de la région CR4 de l'enhancer distal de *mOct4* et l'expression de SSEA1. Le milieu et la technique de passage employés permettent donc d'obtenir des cellules sensiblement plus naïves.

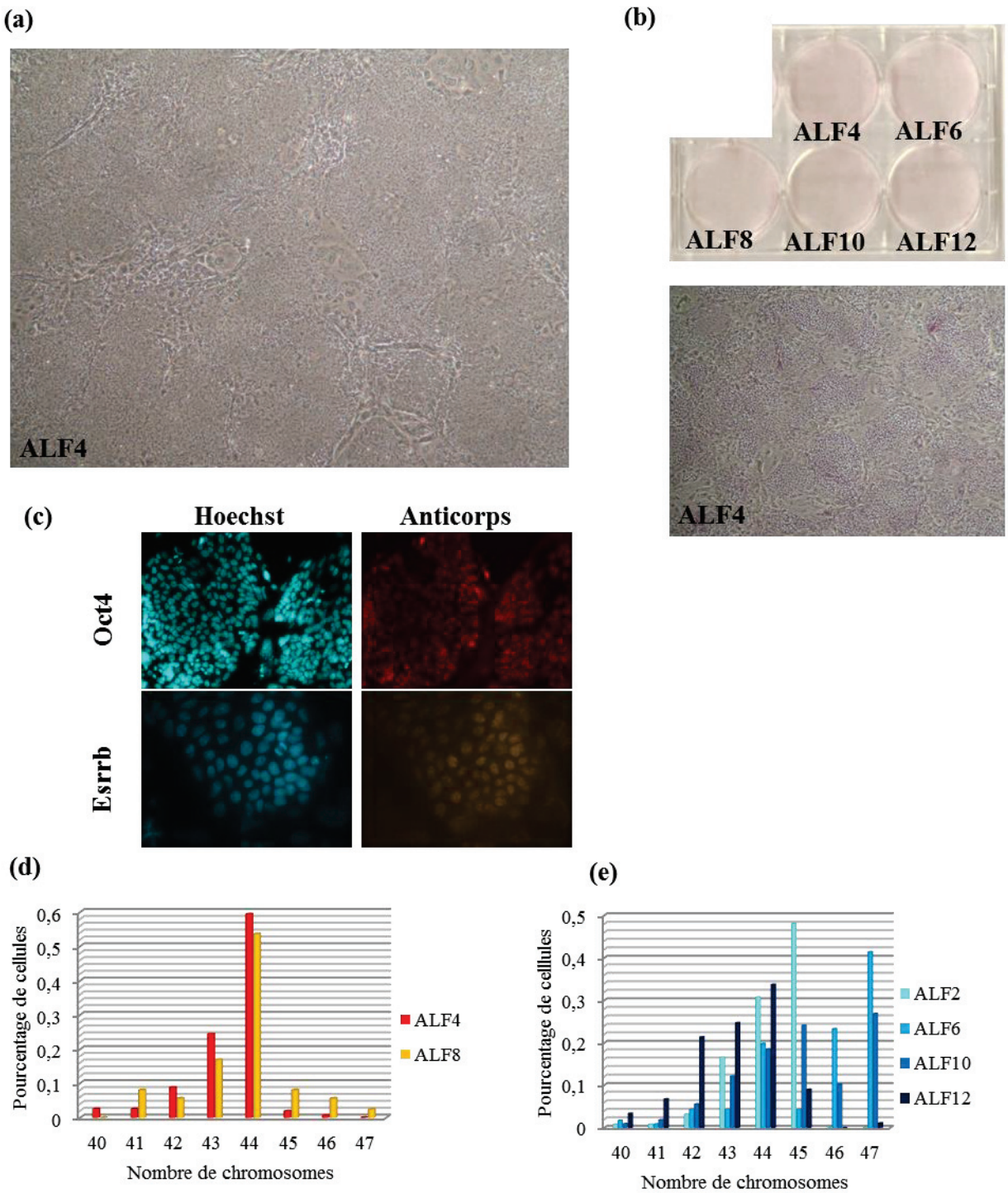


Figure 29: Caractérisation des lignées rbESC-ALF

(a) Morphologie de la lignée rbES-ALF4
(b) Révélation de l'expression de la phosphatase alcaline dans les lignées rbESC-ALF
(c) Révélation de l'expression d'Oct4 et Esrrb dans la lignée rbES-ALF4
(d) Lignées rbESC-ALF ayant un nombre de chromosomes normal à passage 15-20
(e) Lignées rbESC-ALF ayant un nombre de chromosomes anormal à passage 15-20

2.5.2 Dérivation et caractérisation des lignées rbESC-ALF

La stabilisation des lignées rbES-ALF1/2 a débuté tardivement à des passages élevés et ces lignées ont atteint une cinquantaine de passage en culture avant toute étude. Il est donc apparu préférable de dériver de nouvelles lignées directement dans les mêmes conditions. Dans ce but, j'ai placés les ICMs dans du milieu DMEM/F12 supplémenté avec 10% de KO-SR, 10% de FBS et 1000U/ml de LIF. J'ai également dissocié les cellules en suspension unicellulaire par traitement à l'Accutase dès l'apparition des excroissances. J'ai obtenu 5 nouvelles lignées à partir de 40 ICMs, appelées rbES-ALF4, -6, -8, -10 et -12, soit avec une efficacité de dérivation de 12,5%. Ces lignées ont été comparées aux lignées rbES-ALF1/2 et présentent la même morphologie (Figure 29a). Elles expriment les gènes de pluripotence *Oct4* et *Esrrb* (Figure 29c) et possèdent une activité phosphatase alcaline (Figure 29b). Cependant l'étude de leur caryotype, au passage 20 après dérivation ou adaptation pour la lignée rbES-ALF2, a montré que seules les lignées rbES-ALF4 et -8 possèdent le nombre normal de chromosome (Figure 29d). Il faut noter que la lignée rbES-ALF2 possède 45 chromosomes, alors qu'elle dérive de la lignée rbES-LIF2 qui avait un caryotype normal (42XY). Il semble donc que les passages en suspension unicellulaire augmentent la probabilité de sélectionner des cellules ayant des modifications chromosomiques qui leur apportent un avantage en culture (Figure 29e).

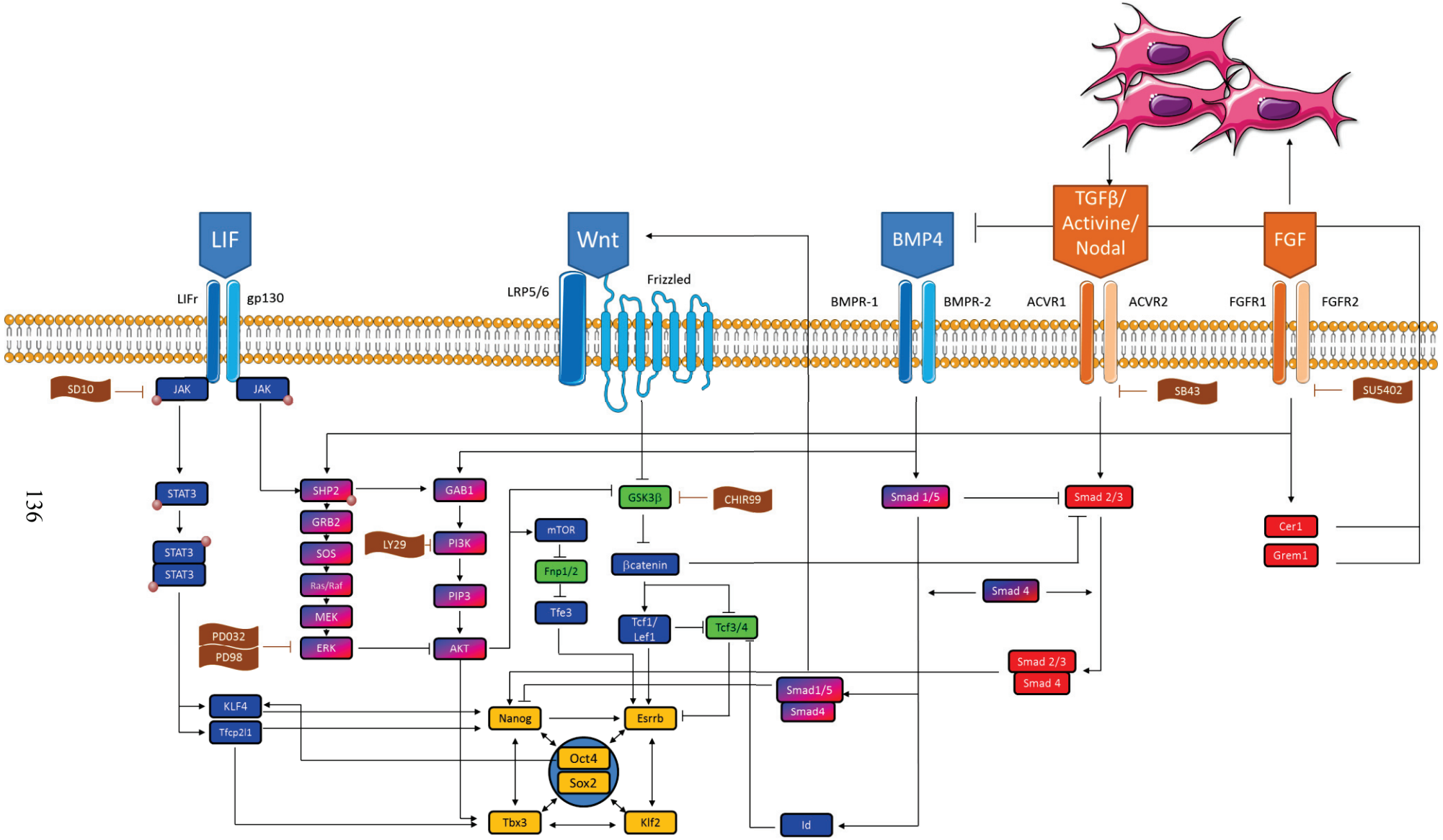
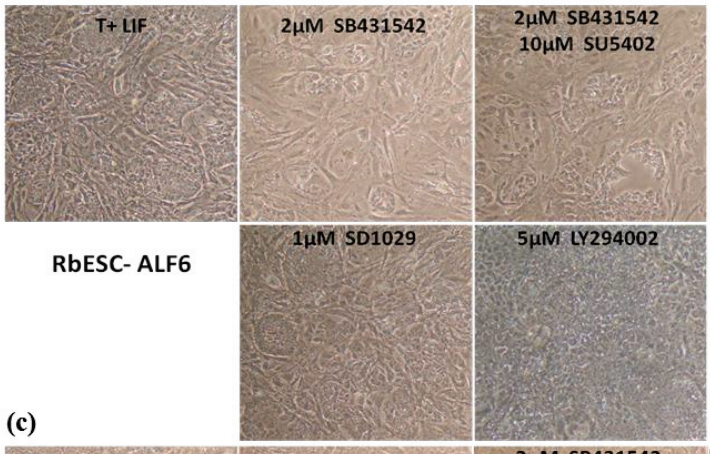


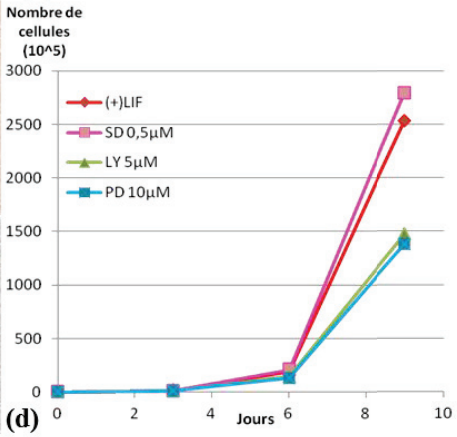
Figure 30: Inihibteurs des voies de signalisation

Légende : Couleur jaune : gène du noyau de pluripotence. Couleur bleue : voies de signalisations permettant l'activation du noyau de pluripotence chez les ESC naïves. Couleur rouge : voies de signalisations permettant l'activation du noyau de pluripotence chez les ESC amorcées. Couleur verte : voies de signalisation entrainant l'inhibition des gènes du noyau de pluripotence. Couleur marron : Inhibiteurs

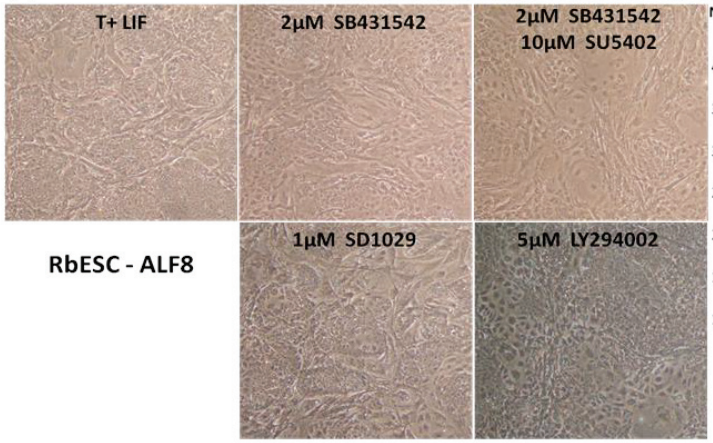
(a)



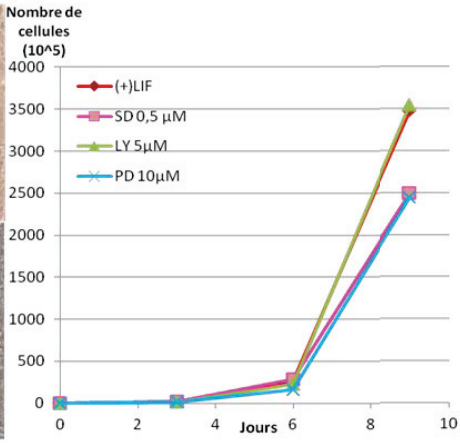
(b)



(c)



(d)



(e)

Voie de signalisation	Inhibiteurs	Concentrations utilisées	Effets sur ALF2 / ALF6 / ALF10 / ALF12	Effets sur ALF4 / ALF8
LIF/STAT3	Témoins positif : présence de LIF	1000U/mL	0	0
LIF/STAT3	Témoin négatif : Absence de LIF	/	0	0
LIF/STAT3	SD1029	1 µM	0	+
Activine	SB431542	2µM	++	++
FGF	SU5402	20µM	0	+
Activine/FGF	SB431542 & SU5402	2µM & 20µM	++	++
PI3K	LY294002	5µM	+	++
MAPK	PD98059	10µM	+	++

Figure 31: Effets de l'inhibition des voies de pluripotences sur les rbESCs ALF.

(a) Morphologie de la lignée rbESC-ALF6 pour chaque inhibiteur.
(b) Courbe de croissance de la lignée rbES-ALF6 selon chaque inhibiteur
(c) Morphologie de la lignée rbESC-ALF8 pour chaque inhibiteur.
(d) Courbe de croissance de la lignée rbES-ALF8 selon chaque inhibiteur
(e) Tableau indiquant les niveaux de différenciation des 6 lignées selon la morphologie et les courbes de croissances en fonction de chaque inhibiteur. Les lignées sont séparées en 2 colonnes selon leur caryotype anormal (gauche) et normal (droite) (0 : pas de différenciation ; + différenciation partielle ; ++ différenciation totale).

Pour déterminer si le LIF stimule l'autorenouvellement des lignées RbESC-ALF, j'ai cultivé les cellules en absence de LIF pendant plusieurs passages. Aucune différenciation n'a été observée dans les cultures, montrant l'absence d'effet du LIF sur l'autorenouvellement. Ce résultat peut cependant être biaisé par le fait que les MEFs sécrètent du LIF de manière autocrine, qui est emprisonné dans la matrice extra-cellulaire (ECM) (Rathjen et al., 1990).La matrice libère le LIF, comme d'autres facteurs de croissance (y compris du FGF), par le biais d'enzymes, les MMPs (Matrix Metalloprotéinases), facteurs qui contribuent au maintien de la pluripotence des cellules (Przybyla et al., 2013). Afin d'identifier les facteurs essentiels au maintien de l'autorenouvellement des lignées rbESC-ALF, j'ai ajouté aux cultures des inhibiteurs chimiques des différentes voies de signalisation classiquement impliquées dans la pluripotence des mESCs et hESCs : la voie LIF/STAT3 (inhibiteur des kinases JAK2 : SD1029 - appelé JAKi), la voie FGF/MAPK (inhibiteur du FGFR : SU5402), la voie Activine/Smad2 (SB431542 – appelé ALKi), la voie des MAPKs (inhibiteur de ERK : PD98059) et la voie de la PI3K (LY294002) (Figure 30). Les résultats obtenus montrent que les cellules se différencient en présence des inhibiteurs des voies FGF et Activine (Figure 31). De plus l'inhibition des voies de la PI3K et des MAPKs, qui ont une action en aval des voies FGF et Activine, entraine également une variation de morphologie et de croissance des cellules. Un effet différent de l'inhibiteur de la voie LIF/STAT3 sur la morphologie des cellules ayant un caryotype normal (rbES-ALF4 et -8) ou pas (rbES-ALF2, -6, -10 et -12) a aussi été observé, mais ce résultat n'a pas pu être confirmé par l'analyse de l'expression des gènes de pluripotence en RT-qPCR. L'ensemble de ces résultats montre que les lignées rbESC-ALF, tout comme les lignées rbESC-LIF sont toujours dépendantes des voies FGF et Activine, malgré leur dérivation et leur culture en présence de LIF.

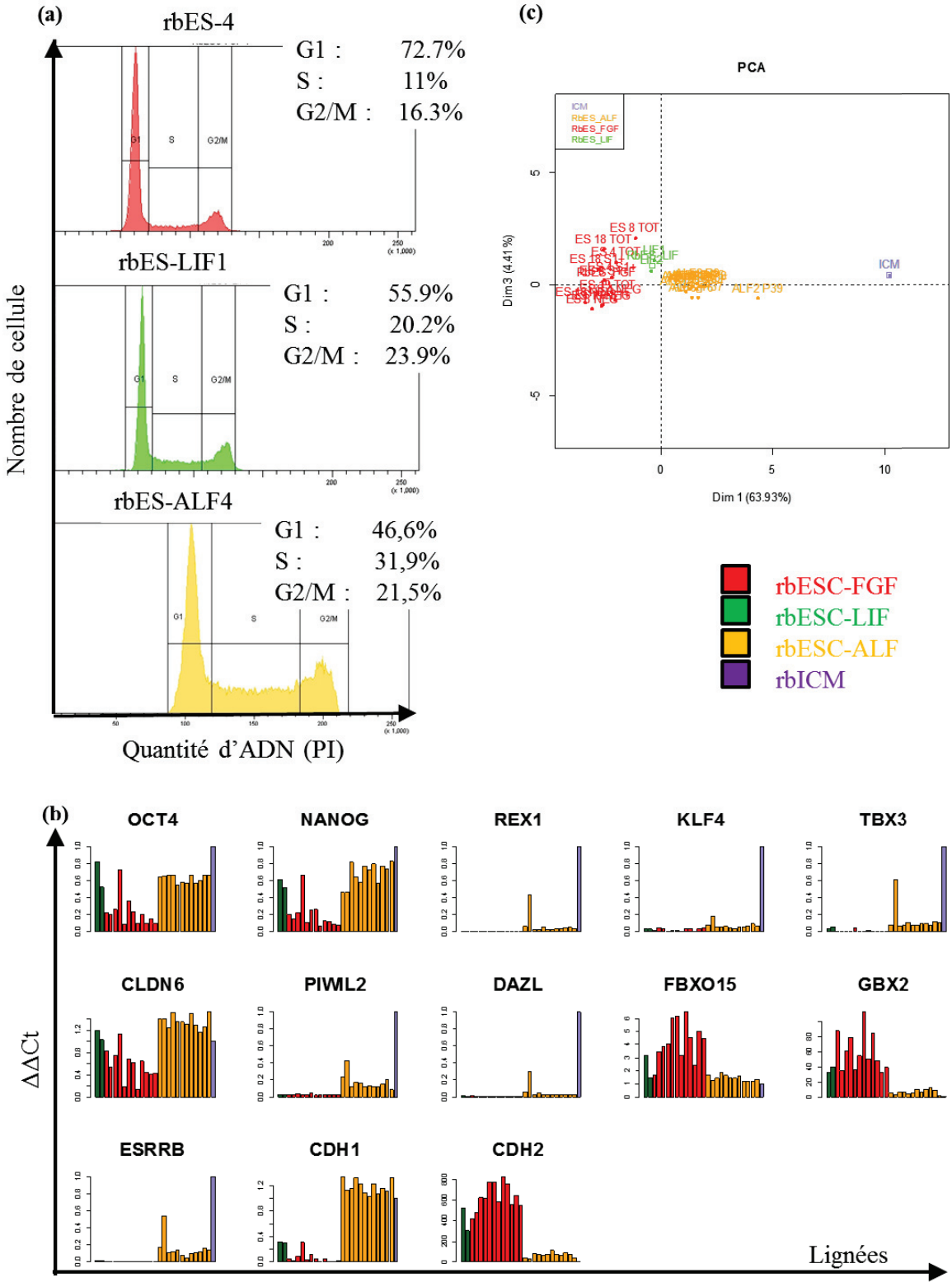


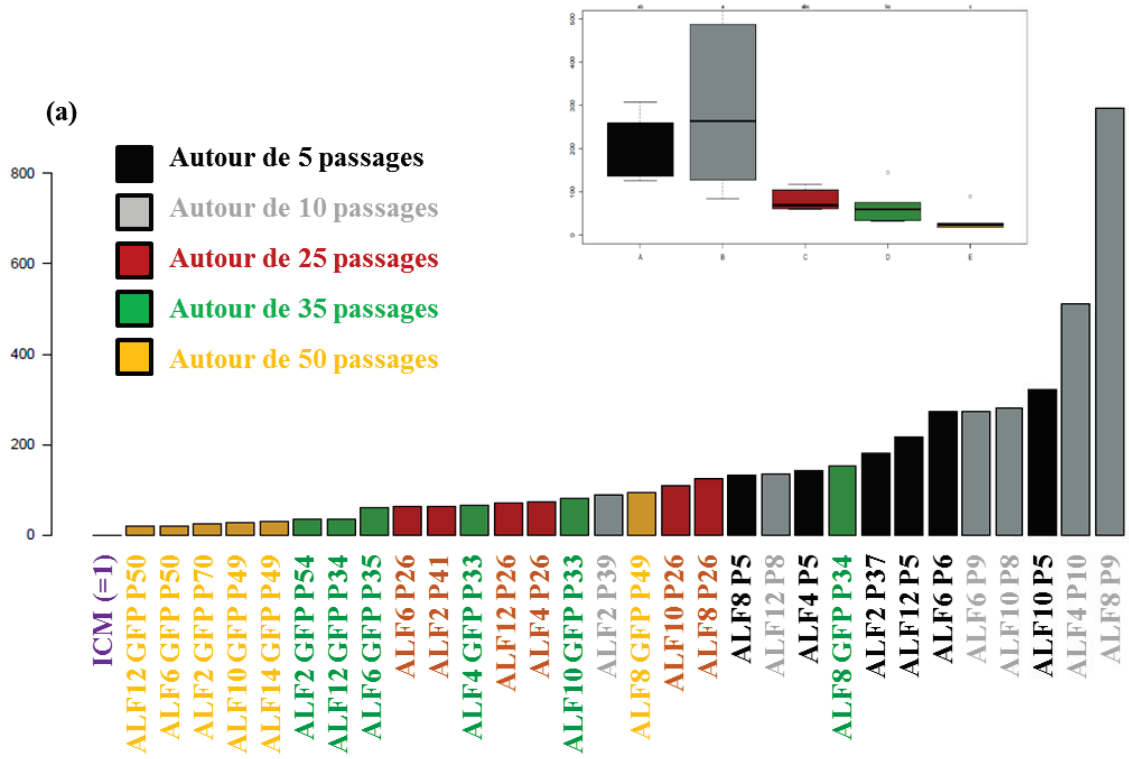
Figure 32: Comparaisons des 3 types de lignées

(a) Cycles cellulaire des lignées rbES-4, rbES-LIF1 et rbES-ALF4
(b) Histogramme de l'expression des gènes de pluripotence sur les 3 types de lignées en comparaison des cellules de l'ICM
(c) PCA basée sur l'expression des gènes analysés précédemment.

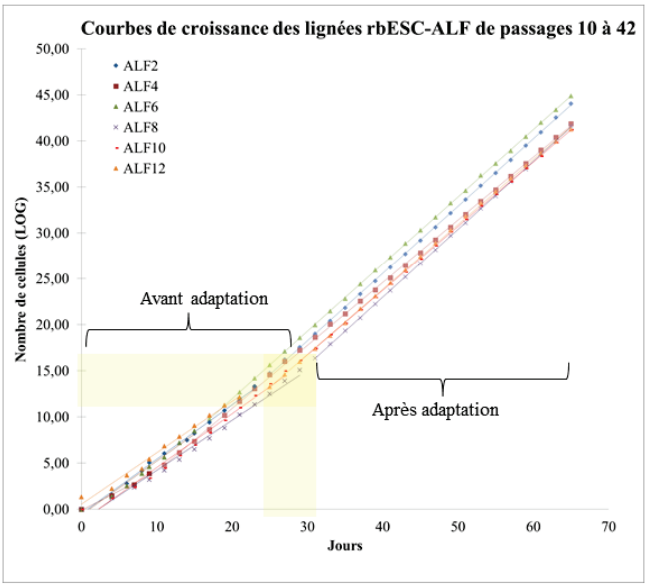
2.5.3 Caractérisation moléculaire des rbESC-ALF

Les lignées rbESC-ALF prolifèrent beaucoup plus rapidement que les lignées rbESC-LIF et rbESC-FGF, puisque les passages cellulaires sont effectuées tous les 2 jours contrairement aux deux autres types qui nécessitent un passage tous les 3 à 4 jours. J'ai donc analysé leur cycle cellulaire par cytométrie en flux après un marquage PI. Les résultats obtenus montrent une diminution de la proportion de cellules en phase G1 correspondant aux modifications des conditions de culture. On passe ainsi de 70% pour les rbESC-FGF, à 55% pour les rbESC-LIF et à 46% pour rbESC-ALF (Figure 32a). La proportion de cellules en phase S augmente conjointement avec 11% pour les rbESC-FGF, à 20% pour les rbESC-LIF et à 32% pour rbESC-ALF. Les profils du cycle cellulaire des lignées rbESC-ALF sont en accord avec l'augmentation observée de la prolifération de ces cellules et se rapprochent du profil des PSCs murines.

L'expression des gènes de pluripotence dans les lignées rbESC-ALF a été comparée par RT-qPCR à celle observée dans les lignées rbESC-FGF et rbESC-LIF. Les gènes analysés choisis sont de trois types : les gènes de pluripotence *Oct4* et *Nanog*, les gènes spécifiquement exprimés dans les mESCs naïves (*Rex1, Dazl, Blimp1, Fgf4, Tbx3, Piwil2, Pecam1, Fbxo15, Gbx2, Cdh1, Tfcp2l1, Klf4, Dax1* et *Esrrb*) et les gènes spécifiquement exprimés dans les mEpiSCs amorcées (*Lefty2, Cldn6, Cdh2, Cdx2, Otx2* et *Pitx2*). Les résultats ont été standardisés avec l'expression du gène de ménage est *Tbp* et normalisés par rapport à l'expression des gènes dans les cellules de l'ICM (Figure 32b). Dans un premier temps, lorsqu'on regarde l'expression des gènes un par un, on peut s'apercevoir que les gènes de pluripotence naïve *Rex1, Blimp1, Esrrb, Pecam1* et *Tbx3* sont plus fortement exprimés dans les lignées rbESC-ALF en comparaison des lignées rbESC-FGF et rbESC-LIF. De même, *Cdh1*, le gène de la cadhérine E qui est un marqueur naïf, est surexprimé dans les lignées rbESC-ALF, alors que *Cdh2*, le gène de la cadhérine N qui est un marqueur amorcé, est sous- exprimé dans ces mêmes lignées. Dans un deuxième temps, lorsqu'on compare ces résultats globalement à l'aide d'une analyse en composante principale (PCA), on peut observer que les lignées rbESC-ALF ont un transcriptome plus proche de celui des cellules de l'ICM, alors que les lignées rbESC-FGF ont le transcriptome le plus éloigné et les lignées rbESC-LIF un transcriptome intermédiaire (Figure 32c). L'ensemble de ces analyses indique que les lignées rbESC-ALF présentent plus de caractères naïfs que les autres lignées de rbESCs et sont stabilisées dans un état de pluripotence plus proche de celui de l'ICM.



(b)



(c)

	Avant adaptation		Après adaptation	
	Pente	R^2	Pente	R^2
ALF2	0,5899	0,9967	0,733	0,9999
ALF4	0,4211	0,998	0,6827	0,9998
ALF6	0,5844	0,9851	0,7314	1
ALF8	0,5435	0,9893	0,7402	0,9999
ALF10	0,5824	0,9873	0,6997	0,9999
ALF12	0,5567	0,9889	0,7084	0,9998
MOY/jour	0,5463	0,9908	0,7159	0,9998
Taux de croissance (nb de cellules / Jour)	**3,52**		**5,20**	

(d)

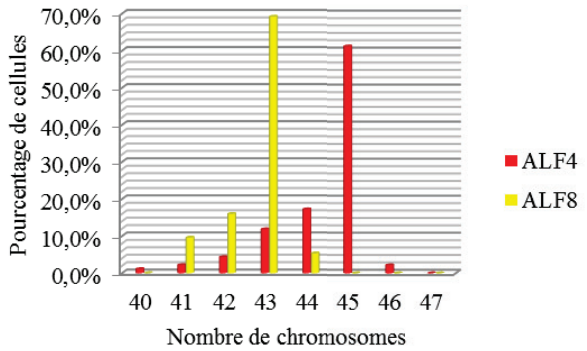


Figure 33: Stabilité des lignées rbESC-ALF

(a) Distances euclidienne basé sur le transciptome des 6 lignées rbESC-ALF par rapport aux cellules de l'ICM, à différents passages. Les boxplots représentent les distances euclidiennes par rapport aux cellules de l'ICM pour chaque passage.

(b) Courbe de croissance des 6 lignées rbESC-ALF entre le passage 10 et 42. La zone surlignée en jaune représente la période d'adaptation.

(c) Tableau regroupant les pentes des régressions linéaires pour chaque lignée (Log). Le R^2 indique le coefficient de correlation. Plus il est proche de 1 plus la régression est robuste. Les pentes ont été moyenné et le taux de croissance calculé. Il représente le nombre de doublement des cellules par jour.

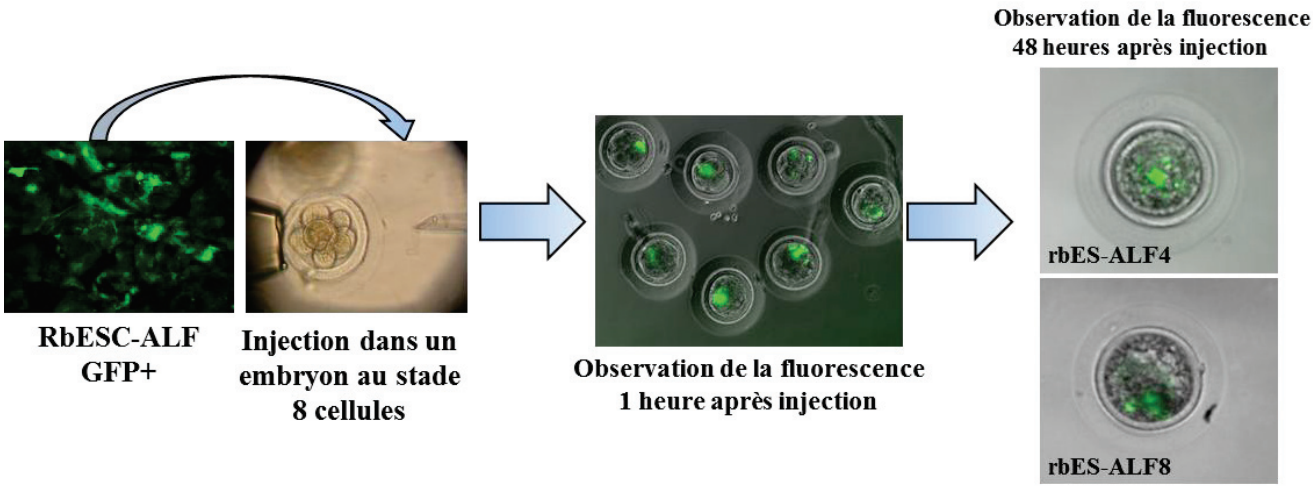
(d) Dénombrement des chromosomes à passage 53 des lignées rbES-ALF4 et 8.

2.5.4 Stabilité génétique des lignées rbESC-ALF

Comme je l'ai précisé lors de la caractérisation des lignées rbESC-ALF, les lignées rbES-ALF4 et 8 possèdent le nombre normal de chromosome, c'est-à-dire 44. De même, la lignée rbES-ALF2 qui dérive de l'adaptation de la lignée rbES-LIF2, dont le caryotype était normal, a acquis un chromosome supplémentaire (Figure 22 et Figure 29). Il semblerait donc que les lignées soient instables lors de passages en suspension unicellulaire à l'aide d'accutase. Ce phénomène n'a pas été observé avec les cellules cultivées en amas, ni avec les lignées rbESC-FGF ou rbESC-LIF, qui n'ont pas acquis de modification de leur nombre de chromosome. Mais il faut noter qu'elles peuvent avoir accumulé d'autres mutations non visibles par cette technique. Les passages unicellulaires permettent sans doute de mieux sélectionner les cellules ayant un avantage en culture, car chaque cellule a la possibilité de se diviser et de former une colonie. Les cellules ayant subi des mutations leur procurant un avantage par rapport aux cellules sauvages, comme par exemple l'acquisition de plusieurs copies d'un ou plusieurs gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence, peuvent être sélectionnées et éliminent par compétition les cellules n'ayant pas acquis cet avantage.

L'analyse par RT-qPCR de l'expression des 22 gènes de pluripotence étudiés précédemment dans les 6 lignées rbESC-ALF, tous les dix passages environ entre les passages 5 et 50, montre qu'au cours des passages successifs les taux des transcrits d'intérêt se rapprochent de plus en plus de ceux des cellules de l'ICM (Figure 33a). Les cellules semblent donc de mieux en mieux adaptées à leur condition de culture. En effet, à partir du passage 10 ou 11, on a constaté un accroissement de la vitesse de prolifération et ce pour les 6 lignées rbESC-ALF (Figure 33b). La vitesse de prolifération passe de 3,52 doublement par jour à 5,10 (Figure 33c). Ce résultat est en accord avec une adaptation des lignées en culture. Cette adaptation se traduit par une anomalie du nombre de chromosome des lignées rbES-ALF4 et -8, qui ont soit perdu un chromosome (lignée rbES-ALF8), soit acquis un chromosome supplémentaire (lignée rbES-ALF4) au passage 53 (Figure 33d). Ce résultat indique que les conditions de cultures utilisées ne permettent pas de maintenir la stabilité génétique des lignées de rbESCs et que ce phénomène est amplifié lors de passages des cellules en suspension unicellulaire.

(a)



(b)

Lignées de rbESCs	Nombre d'embryons injectés	Nombre de blastocyste	Nombre de blastocyste contenant des cellules GFP	Taux de colonisation
ALF2	41	40	2	**5 %**
ALF4	120	113	17	**15,04 %**
ALF6	41	41	10	**24,39 %**
ALF8	109	105	17	**16,19 %**
ALF10	45	44	9	**20,45%**
ALF12	50	40	4	**10 %**

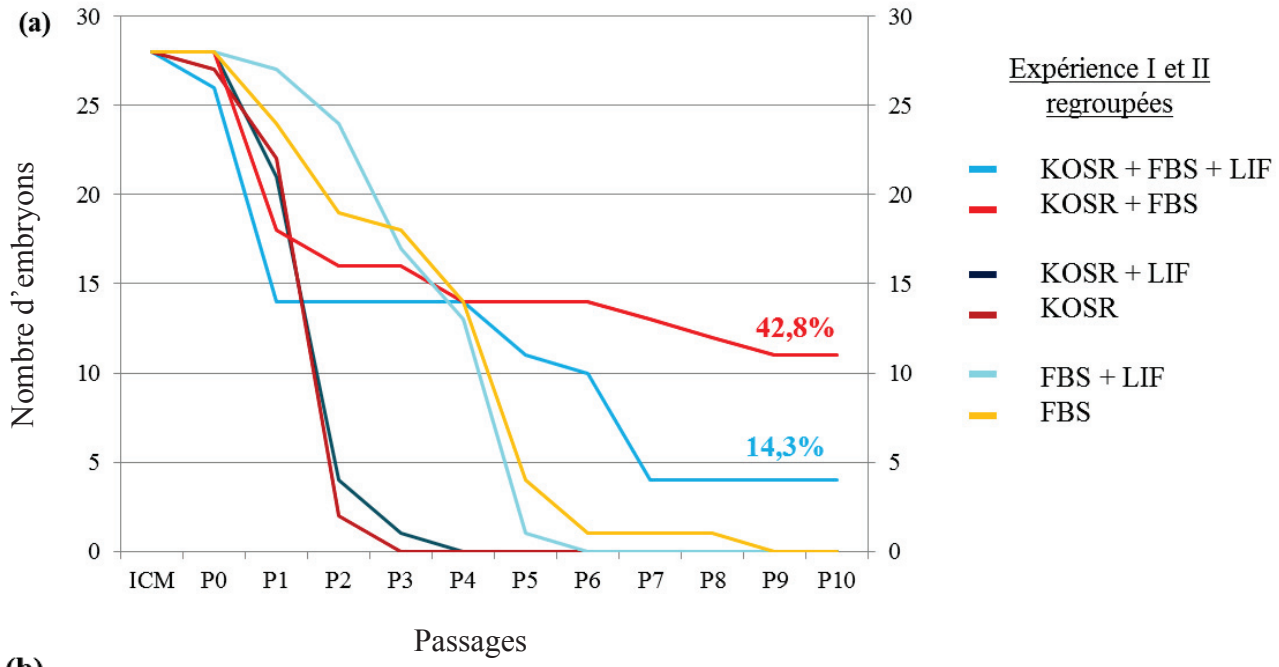
Figure 34: Injections des lignées de rbESC-ALF dans des embryons au stade 8 cellules

(a) Plan expérimental de l'injection. Les rbESC-ALF GFP+ sont microinjectées dans des embryons aux stades 8 cellules. La présence de cellules GFP dans les embryons est analysée 1 heure après injection. Ensuite on observe la présence des cellules dans le blastocyste 48 heures plus tard.
(b) Résultats des expériences d'injection de RbESC-ALF GFP dans des embryons 8 cellules

2.5.5 Production de chimères avec les lignées rbESC-ALF

L'obtention de chimère somatique et germinale est considérée comme la preuve ultime de l'état naïf des lignées de PSCs. Afin d'étudier la capacité des lignées rbESC-ALF à coloniser un embryon receveur, celles-ci ont été infectées avec un lentivecteur exprimant le gène de la GFP à partir du promoteur CAG, puis microinjectées dans des embryons de lapin au stade 8-cellules. Les embryons ont ensuite été cultivés pendant 48h jusqu'au stade jeune blastocyste. Les blastocystes ont ensuite été observés au microscope à fluorescence pour rechercher l'expression de la GFP dans les ICMs des embryons (Figure 34a). Le taux de colonisation des embryons obtenu fluctue entre 5% pour la lignée rbES-ALF2 et 24% pour la lignée rbES-ALF6 (Figure 34b). Ce taux, encore faible en comparaison des taux obtenus avec des mESCs (jusqu'à 90% de colonisation d'un ICM), est très encourageant puisqu'aucune colonisation n'avait été observée avec les lignées rbESC-FGF. Il pourrait être suffisant pour créer des chimères somatiques. Cependant, il est nécessaire d'analyser l'intégration des cellules rbESC-ALF dans l'ICM d'embryons à un stade plus tardif du développement. En effet, au stade jeune blastocyste, il est très difficile d'établir la présence ou de cellules dans l'ICM et le taux de multiplication des cellules injectées. Avec 24 à 48h de culture supplémentaire et une élimination du manteau muqueux et de la membrane pellucide, les embryons peuvent alors poursuivre leur développement jusqu'au stade épiblaste où le disque embryonnaire est formé. Ces expériences sont en cours et permettront de vérifier la capacité réelle des lignées rbESC-ALF à coloniser un embryon.

(a)



(b)

Nb d'ICM isolés	LIF	I	II	III
KOSR/FBS	+	20	8	35
	-	20	8	35
KOSR	+	20	8	
	-	20	8	
FBS	+	20	8	
	-	20	8	

Figure 35: Analyses des lignées dans différent milieux (1)

(a) Courbe de dérivation dans les 6 conditions (Expériences I et II regroupées)
(b) Tableau résumant le nombre d'ICMs isolés lors des trois expériences

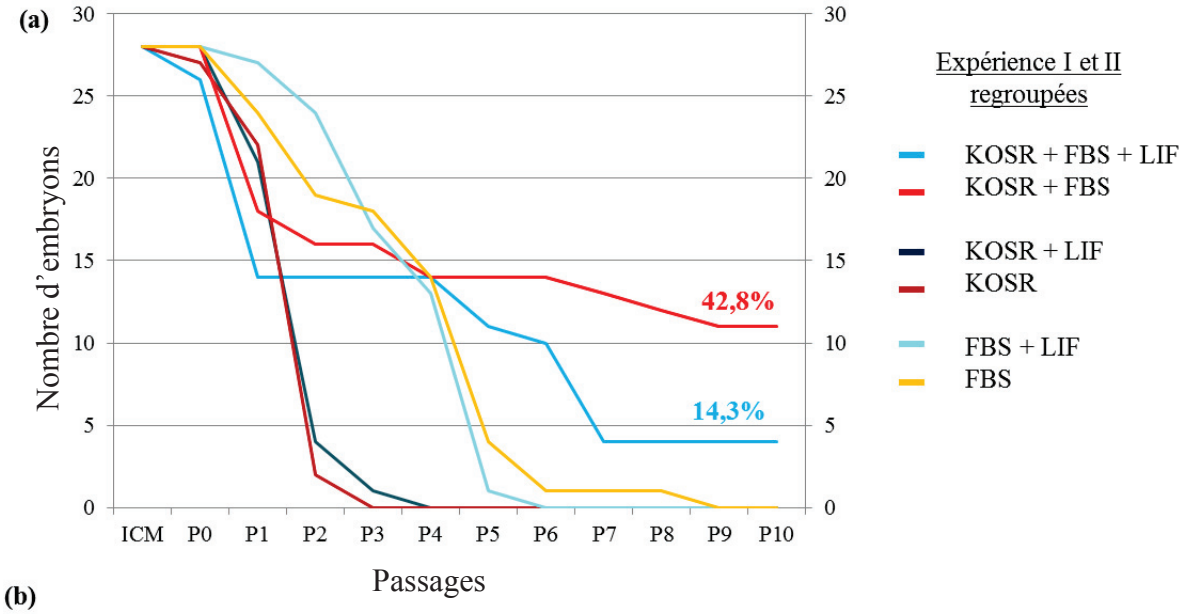
2.6 Le rôle du LIF

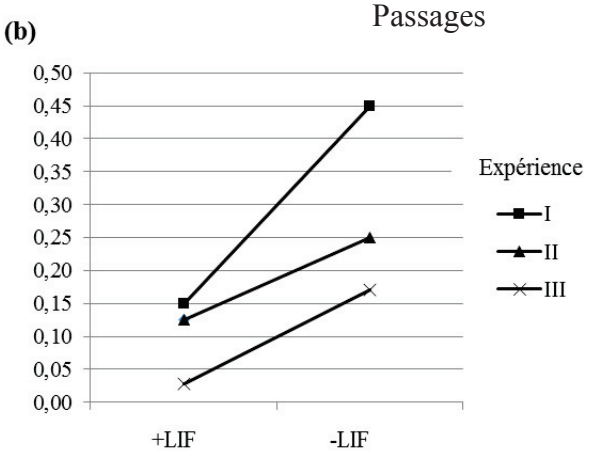
2.6.1 Le rôle du LIF dans la dérivation

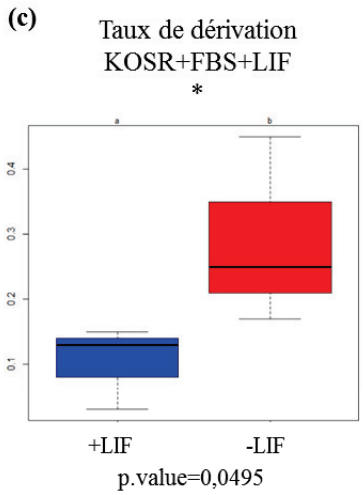
Nous avons vu précédemment que le LIF utilisé pour cultiver les rbESC-LIF et rbESC-ALF n'était pas nécessaire à leur maintien en autorenouvellement et que ces lignées étaient seulement dépendantes des voies FGF et Activine. En revanche, le LIF pourrait être important pour les toutes premières étapes de la dérivation des cellules en culture, c'est-à-dire pour l'établissement des lignées. Pour répondre à cette question, j'ai comparé les efficacités de dérivations obtenues en présence ou en absence de LIF.

2.6.1.1 L'ajout de LIF en présence ou non de FBS

Dans les expériences réalisées précédemment, deux paramètres avaient varié en même temps, le LIF à la place de FGF2, et l'ajout de FBS dans le milieu de dérivation. Afin d'analyser ces deux paramètres, j'ai isolé 120 ICMs qui ont été ensemencés sur MEF dans 6 conditions différentes (20 ICMs par condition) consistant en 3 milieux DMEM/F12 supplémentés avec 10% FBS, 20% KO-SR, ou 10% KO-SR + 10% FBS, en présence ou non de LIF (Expérience I). Le taux d'adhésion des ICMs aux MEF est identique entre les conditions et varie entre 93% et 100% (Figure 35a). Pour toutes les conditions, le protocole a été identique avec un 1er passage manuel des excroissances suivi d'une dissociation des cellules en tubes Eppendorf® avec de l'accutase ; puis les passages suivants ont consisté en une dissociation directe dans le puits de culture de toutes les colonies toujours avec de l'accutase. Les résultats obtenus sont très différents selon les milieux (Figure 35a). Les ICMs placés dans du milieu contenant seulement du KO-SR, avec ou sans LIF, n'ont pas pu être passés au-delà du 2ème passage. Ceux placés milieu FBS, avec et sans LIF, n'ont pu atteindre que le 4ème passage à l'exception d'une lignée cultivée en absence de LIF qui a atteint le passage 9. Ainsi aucune de ces 4 conditions n'a permis le maintien de la pluripotence des rbESCs en culture. En revanche, en présence du mélange de KO-SR et de FBS, il est possible de maintenir des lignées au-delà du passage 10, et ce en présence ou absence de LIF. Contre toute attente, le nombre de lignée dérivée en absence de LIF (9 lignées) est plus important que celui obtenu en présence de LIF (3 lignées). Cette expérience a été réitérée 2 fois pour confirmer ce résultat. Une première fois en plaçant 8 embryons dans chacune des 6 conditions, le résultat obtenu est alors identique avec 2 lignées







(d)

	+LIF	-LIF
Nombre d'ICM	63	63
Nombres de Lignées	5	17
Taux de dérivation	7.9%	27%

Figure 36: Analyses des lignées dans différent milieux (2)

(a) Courbe de dérivation dans les 6 conditions
(b) Taux de dérivation dans le milieu 10% KOSR / 10% FBS, avec et sans LIF
(c) Boxplot représentant les taux de dérivation dans le milieu 10% KOSR / 10% FBS, avec et sans LIF. p.value <0.05
(d) Tableau résumant le nombre de lignée dérivée en présence ou enabsence de LIF lors des 3 expériences de dérivation.

dérivées en condition KO-SR/FBS sans LIF, une en condition KO-SR/FBS + LIF, et aucune dans les 4 autres conditions (Expérience II). La seconde fois (Expérience III) en ensemençant 35 ICMs dans chacune des 2 conditions KO-SR/FBS avec et sans LIF, le résultat est encore le même avec 1 lignée obtenue en présence de LIF et 6 en absence de LIF (Figure 36b). Au final pour les 3 expériences différentes réalisées, 17 lignées ont été obtenues en absence de LIF (avec un taux de dérivation de 27%) et 5 en présence de LIF (avec un taux de dérivation de 8%), soit un nombre de lignées 3 fois moins élevé en présence de LIF (Figure 36c et d). Ces expériences de dérivation montrent d'une part qu'il est impossible de stabiliser des lignées de rbESCs en présence seulement de FBS ou de KO-SR, et d'autre part que le taux de dérivation de rbESC est plus élevé en absence de LIF qu'en présence de LIF (27% contre 8%). Ces résultats vont à l'encontre des données de dérivation de mESC, puisque le LIF semble avoir un effet défavorable sur l'efficacité de dérivation des lignées de rbESCs.

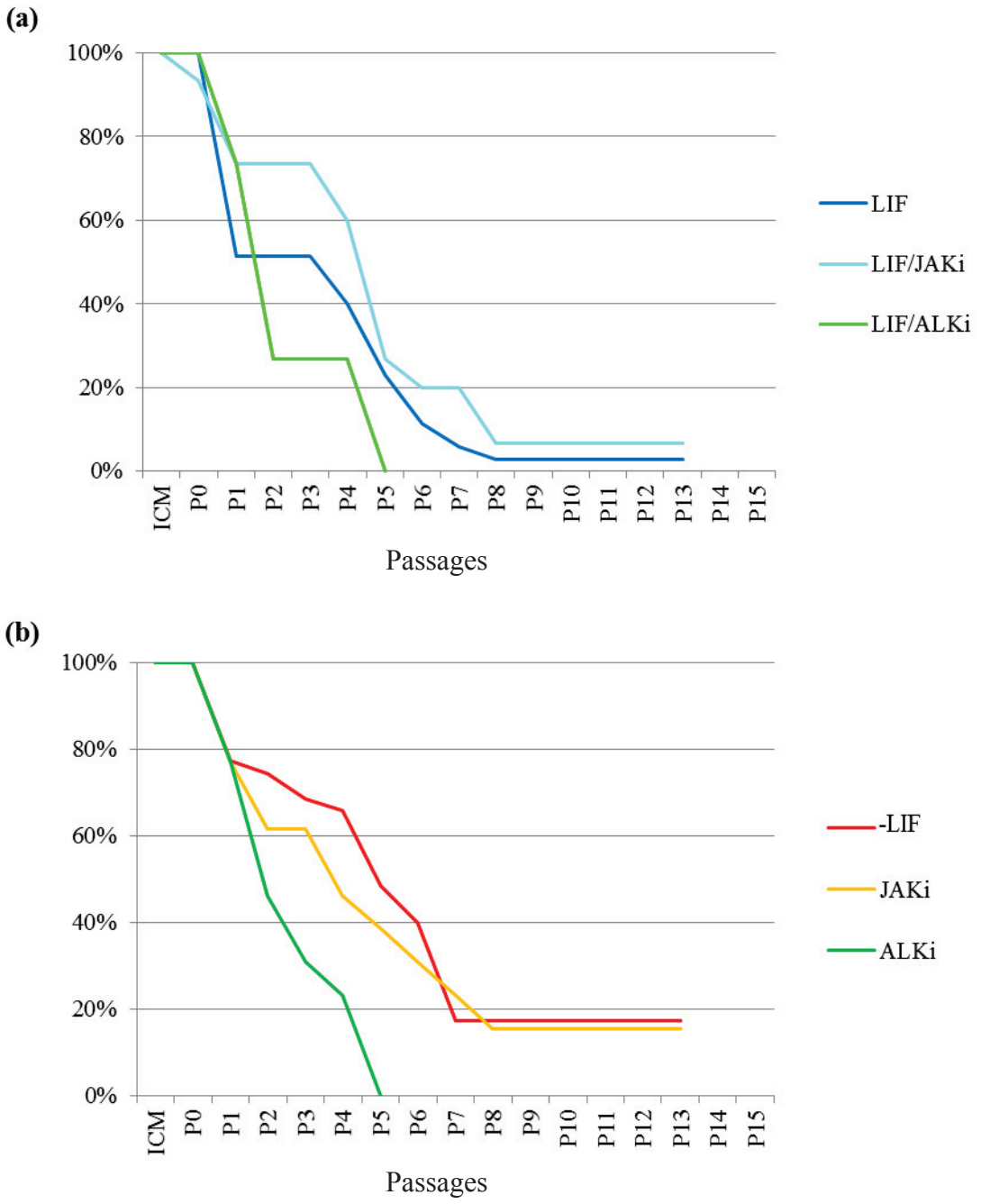


Figure 37: Courbe de dérivation en présence des inhibiteurs de JAK et d'ALK

(a) En présence de LIF
(b) En absence de LIF
JAKi : SD1029, 1µM ; ALKi : SB431542, 2µM

2.6.1.2 L'inhibition de la voie de signalisation du LIF

Les résultats précédents montrent que l'absence de LIF facilite la dérivation de nouvelles lignées. Mais ce résultat n'élimine pas l'effet potentiel du LIF secrété par les MEF. Afin d'apprécier l'effet du LIF endogène, j'ai réalisé des dérivations de rbESC en présence d'un inhibiteur des kinases JAK, le SD1029 à 1µM (JAKi). 15 ICMs ont ainsi été ensemencés sur MEF dans le milieu DMEM/F12 + 10%KO-SR/10%FBS en présence de LIF + JAKi et 13 ICMs en présence de JAKi uniquement, avec en témoins les 35 ICMs dérivés en en présence ou en absence de LIF de la 3ème expérience décrite précédemment. Comme nous l'avons vu précédemment pour les ICMs témoins, une seule lignée a été dérivée en présence de LIF (3%) et 6 en absence de LIF (17%). Concernant les ICMs placés en présence de JAKi, 1 lignée sur 15 ICMs a pu être stabilisée en présence LIF (6.7%) et 2 lignées sur 13 en absence de LIF (15%) (Figure 33a et b). Ce résultat confirme donc l'absence de rôle facilitateur du LIF lors de la dérivation des rbESCs.

Dans la même expérience, j'ai voulu confirmer le rôle de la voie de signalisation de l'Activine, en utilisant un inhibiteur de la phosphorylation de Smad2, SB431542 à 2µM (ALKi). Ainsi 15 ICMs ont été ensemencés en présence de LIF + ALKi et 13 en présence seulement d'ALKi. Dans ces deux derniers cas, aucune lignée n'a pu proliférer au-delà du 5ème passage (Figure 33a et b), montrant que la voie de signalisation Activine/Samd2 est essentiel à l'établissement et au maintien en culture de lignées de rbESCs et que le LIF n'a pas d'effet sur la stabilisation des cellules embryonnaires de lapin en culture.

L'ensemble de ces résultats reste toutefois à confirmer du fait du faible nombre d'ICM mis en culture en présence d'inhibiteurs JAKi ou ALKi (entre 13 et 15 par conditions), et ce d'autant plus que le taux de dérivation des lignées témoins en présence de LIF n'est que de 3% en comparaison du taux de 12,5% obtenu avant, lors de la dérivation des lignées rbESC-ALF. Il est fort probable que l'augmentation du nombre d'embryon traité ne confirmerait pas de variation entre les taux de dérivation obtenus en condition LIF + JAKi et JAKi seul. Toutefois, il faut noter qu'il est possible d'obtenir des lignées en présence de JAKi, ce qui montre que le LIF n'est pas indispensable à la dérivation de lignée de rbESC.

2.6.2 Le rôle du LIF dans les lignées stabilisées.

2.6.2.1 Analyse par RT-qPCR

Les expériences précédentes montrent que le LIF n'est pas requis pour la stabilisation en culture des rbESCs, mais qu'au contraire il aurait plutôt un effet défavorable sur l'efficacité de dérivation. Cela signifie que les cellules embryonnaires de lapin sont probablement réceptives au LIF. Ce résultat est en accord avec les données publiées par l'équipe de S. Bösze qui montrent une expression du récepteur au LIF chez l'embryon au stade blastocyste (Catunda et al., 2008). Afin de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans cette réceptivité des cellules aux LIF, j'ai analysé l'expression en RT-qPCR des gènes de pluripotence ainsi que de plusieurs gènes impliqués dans la voie LIF/STAT3, à savoir les gènes codant pour le récepteur hétérodimérique du LIF, *Lifr* et *gp130,* ainsi que des gènes cibles de STAT3 fortement activés par le LIF dans les mESCs, *Sp5, Zfp36, Cyp1b1* et *C-fos*. D'autres cibles de STAT3 telles que *Socs3, JunB* ou *c-Jun* n'ont pu être analysées à cause du faible niveau d'annotation du génome du lapin. Il faut noter cependant que les gènes *Klf4, Tfcp2l1* et *Dax1*, présents dans le panel habituellement étudié, sont également des gènes cibles de STAT3. Par ailleurs, nous avons aussi étudié l'expression des gènes *Dppa2* et *Dppa5* qui sont associés à l'état naïf de pluripotence chez la souris et qui sont fortement exprimés dans les cellules de l'ICM de lapin (Figure 24a)

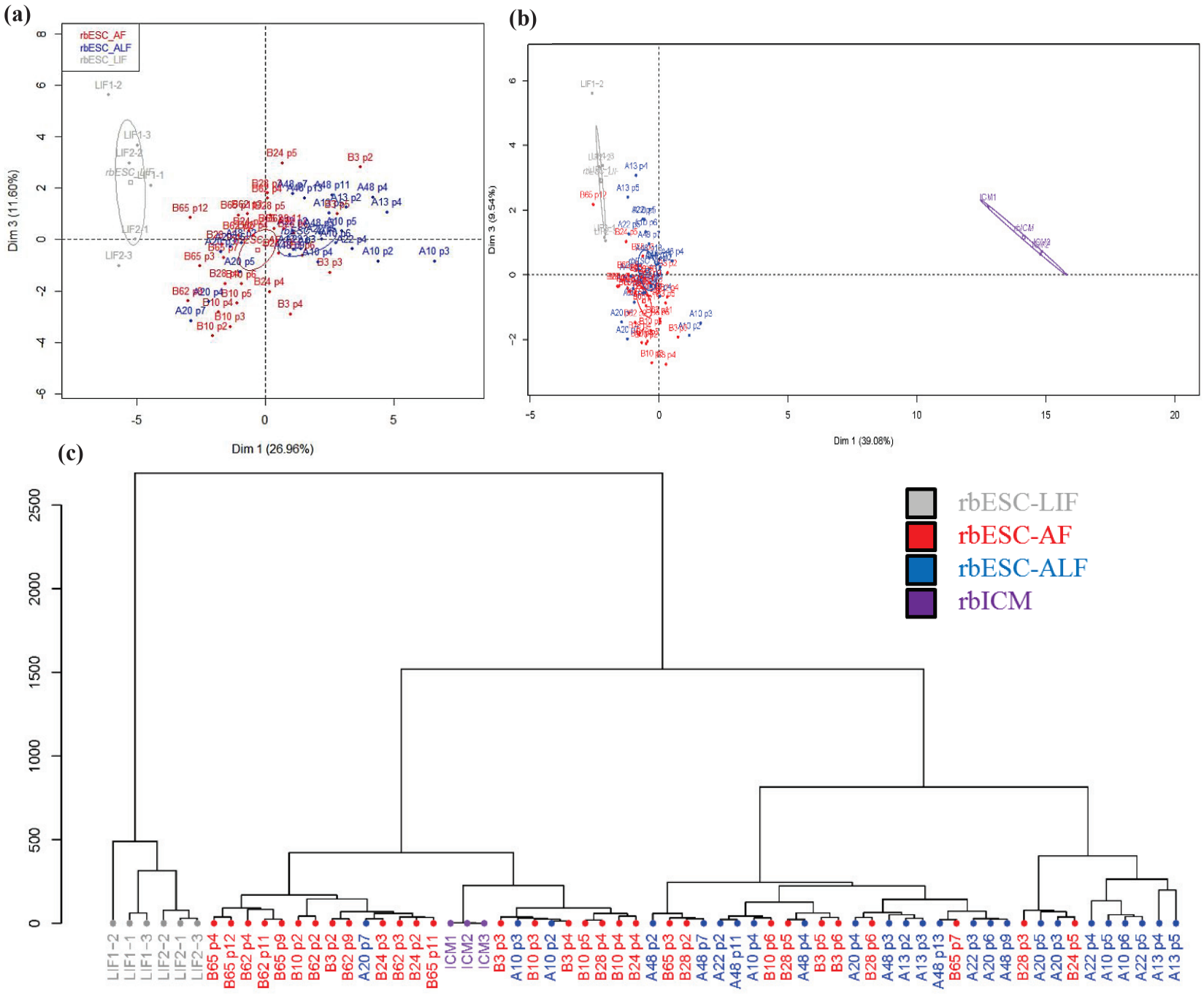


Figure 38: Analyses comparatives des lignées rbESC-ALF, rbESC-AF et rbESC-LIF

(a) PCA représentant l'expression de tous les transcrits des différentes lignées

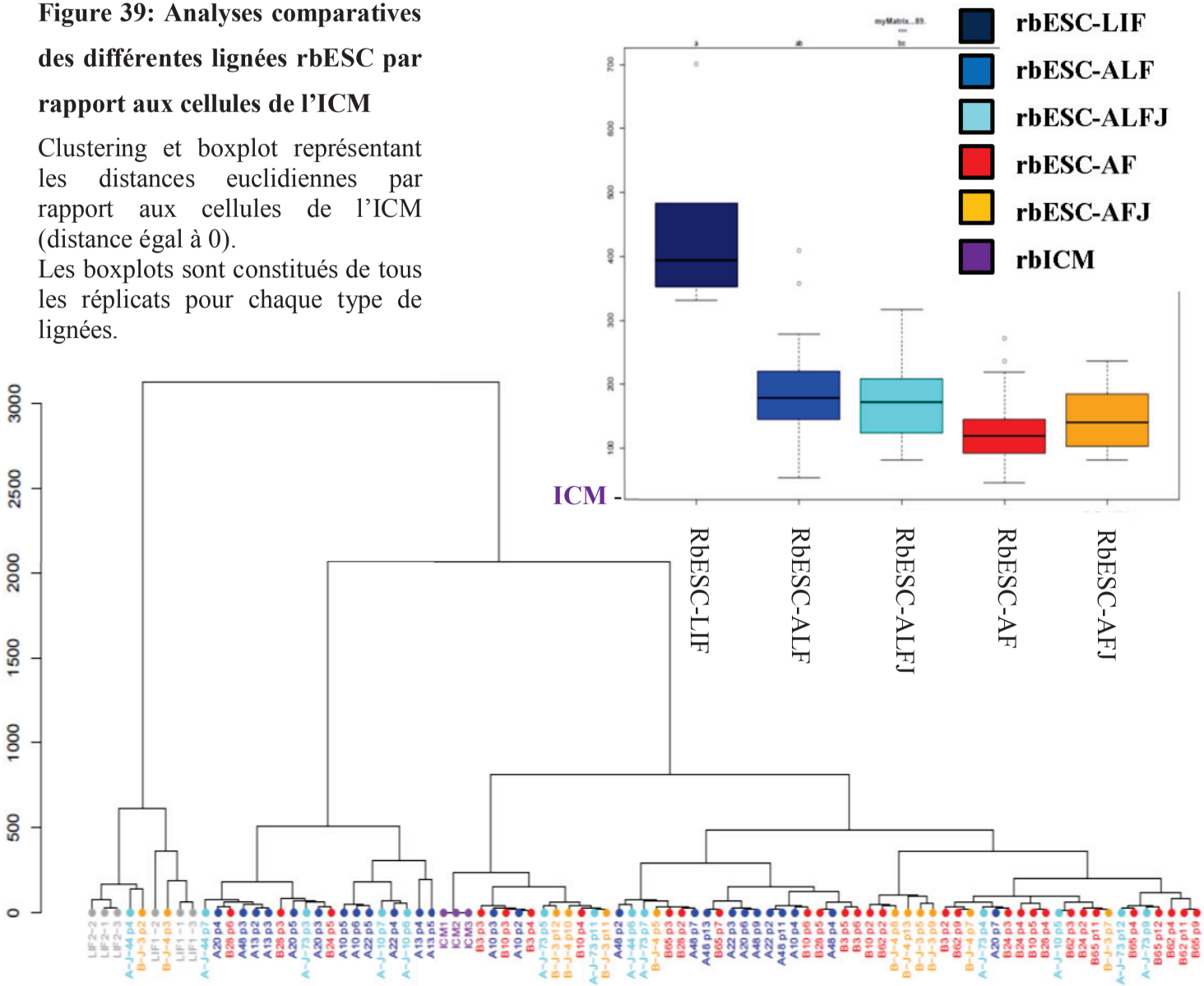
(b) PCA représentant l'expression de tous les transcrits entre les différentes lignées de rbESCs et les cellules de l'ICM

(c) Clustering représentant l'expression de tous les transcrits entre les

J'ai tout d'abord comparé le transcriptome de 5 nouvelles lignées rbESC-ALF dérivées en présence de LIF et nommées A10, A13, A20, A22 et A48, avec 6 lignées de type rbESC-AF dérivées en absence de LIF et nommées B3, B10, B24, B28, B62 et B65, et avec les 2 lignées rbESC-LIF dérivées en présence de LIF et cultivées en amas (rbES-LIF1 et rbES-LIF2). Pour chaque lignée, 3 replicats biologiques correspondant aux mêmes cellules à 3 passages différents ont été analysés (Figure 38). La 1ère PCA, qui compare les replicats biologiques de ces différentes lignées, montre que les lignées rbESC-ALF et rbESC-AF ont des transcriptomes très proche mais tout de même différents, car les ellipses qui représentent la probabilité d'une cellule donnée d'appartenir à un sous-ensemble donné (probabilités calculées avec un niveau de confiance de 95%) ne se croisent pas (Figure 38a). En revanche, les lignées dissociées en suspension unicellulaire ont un transcriptome différent de celui des lignées rbESC-LIF qui sont cultivées en amas. La deuxième PCA compare le transcriptome de ces 3 types de lignée à celui des cellules de l'ICM, et montre que les lignées rbESC-ALF et rbESC-AF sont encore très éloignées des cellules de l'ICM, même si elles s'en rapprochent en comparaison des lignées rbESC-LIF (Figure 38b). Ce résultat est confirmé par le clustering selon les distances euclidiennes, représentant la distance séparant chaque replicat des différentes lignées aux trois échantillons de référence représentés par les cellules de l'ICM. Ce clustering montre que la plupart des lignées rbESC-AF sont contenues dans le même cluster que les cellules de l'ICM, à l'inverse des lignées rbESC-ALF et des lignées rbESC-LIF (Figure 38c). Ces résultats nous indiquent donc que les lignées rbESC-AF sont plus proches des cellules de l'ICM que les lignées rbESC-ALF et que les lignées rbESC-LIF en sont les plus éloignées.

Figure 39: Analyses comparatives des différentes lignées rbESC par rapport aux cellules de l'ICM

Clustering et boxplot représentant les distances euclidiennes par rapport aux cellules de l'ICM (distance égal à 0).
Les boxplots sont constitués de tous les réplicats pour chaque type de lignées.



J'ai ensuite comparé les lignées cultivées en présence de JAKi avec les lignées précédentes cultivées en présence (lignées rbESC-ALF et rbESC-LIF) ou en absence de LIF (lignées rbESC-AF). Dans ce but, j'ai analysé l'expression des mêmes gènes pour 3 à 6 passages différents (replicats) de 3 lignées de cellules dérivées avec LIF +JAKi (lignées rbESC-ALFJ, nommées A-J-10, A-J-44 et A-J-73), et de 2 lignées de cellules stabilisées en présence de JAKi seul (lignées rbESC-AFJ, nommées B-J-3 et B-J-4). La comparaison des distances euclidiennes de ces différentes lignées dérivées en présence ou non de JAKi par rapport aux cellules de l'ICM ne montre aucune ségrégation particulière des lignées cultivées en présence de JAKi (Figure 39a). En effet, les différents replicats de ces lignées sont répartis de façon aléatoire dans les différents clusters. Cependant l'analyse de ces mêmes distances euclidiennes regroupées selon le type de lignée montre que les lignées rbESC-ALFJ et rbESC-AFJ sont situées entre les lignées rbESC-ALF et rbESC-AF, les lignées rbESC-AF étant significativement plus proches des cellules de l'ICM que les rbESC-ALF (Figure 39b). Ce résultat montre que les lignées rbESC-AF ont un transcriptome différent des lignées rbESC-AFJ, donc que les cellules dérivées en présence de JAKi sont différentes des cellules stabilisées sans inhibiteur, et par conséquent que la voie de signalisation du LIF est active dans les cellules de l'ICM de lapin mise en culture.

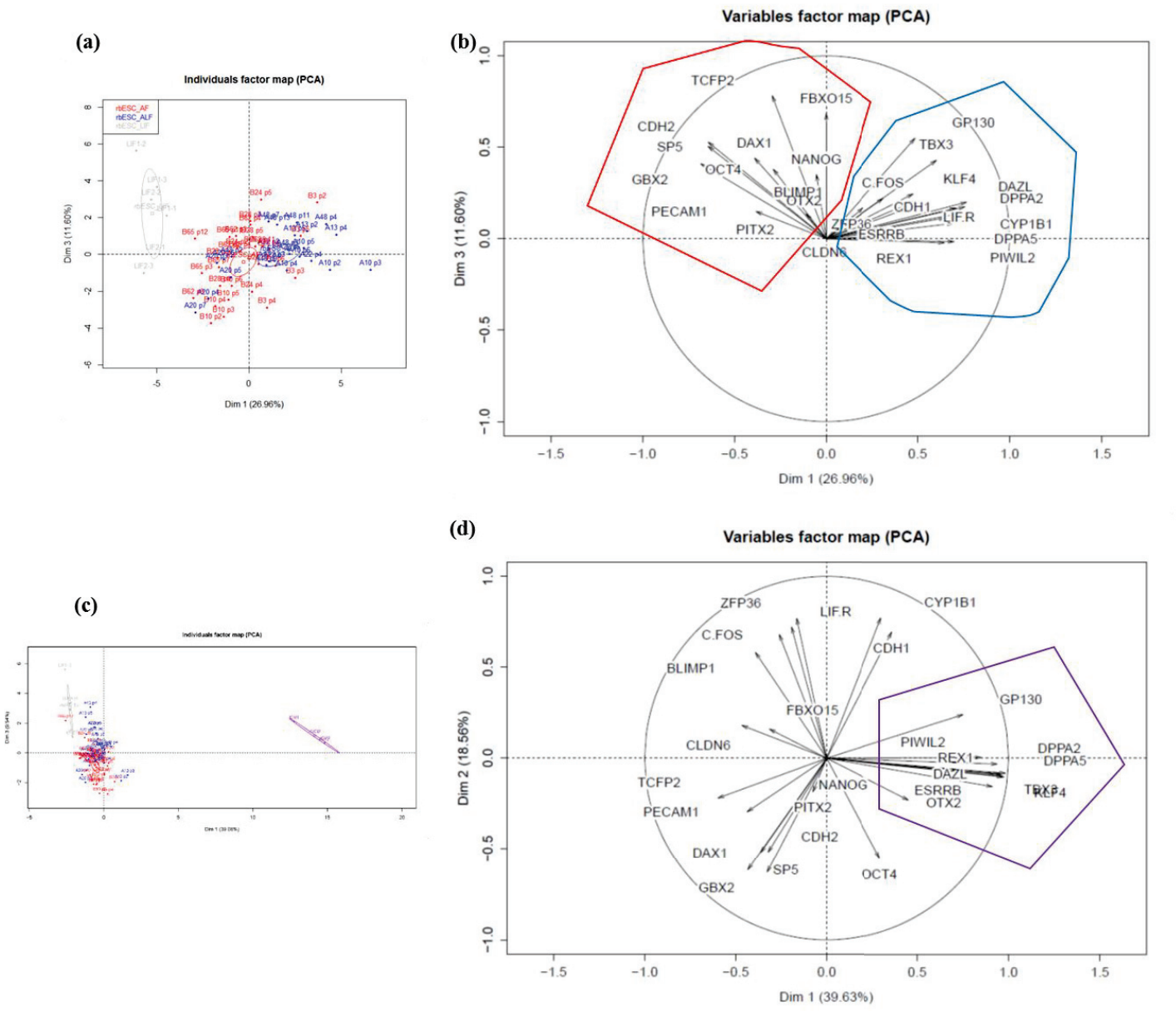


Figure 40: PCA représentant le transcriptome des lignées rbESC-ALF et rbESC-AF

(a) Figure 38a p152

(b) PCA représentant les gènes impliqués dans la ségrégation des deux types de lignées. (En rouge les gènes surexprimés dans les rbESC-AF ; en bleu dans les rbESC-ALF)

(c) Figure 38b p152

(d) PCA représentant les gènes impliqués dans la ségrégation des deux types de lignées avec les cellules de l'ICM. (En violet les gènes surexprimés dans les cellules de l'ICM)

Une analyse plus précise des gènes impliqués dans la différence de transcriptome observée entre les lignées rbESC-ALF et rbESC-AF permet de distinguer deux groupes de gène plus fortement exprimés respectivement dans chacun de ces deux types de lignée. Le premier groupe est composé de gènes surexprimés dans les lignées rbESC-ALF, tels que *Dazl, Dppa2, Dppa5, Cyp1b1, Piwil2, Klf4, gp130, Rex1, Cdh1* et *Tbx3*. Le second groupe comprend les gènes surexprimés dans les lignées rbESC-AF, comme *Tfcp2l1, Gbx2, Sp5, Oct4, Cdh2, Pecam1* et *Dax1* (Figure 40a). La plupart des gènes présents dans le premier groupe, donc surexprimés dans les lignées dérivées en présence de LIF, font partie des gènes les plus fortement exprimés dans les cellules de l'ICM (Figure 40b et Figure 24a). Ainsi, ce résultat montre que les lignées cultivées en présence de LIF (rbESC-ALF) expriment plus fortement les gènes discriminant de l'état ICM de lapin (donc de l'état naïf du lapin), bien que l'analyse de l'ensemble des transcrits désignait les lignées cultivées en absence de LIF (rbESC-AF) comme étant les plus proches des cellules de l'ICM. La présence de LIF semble donc avoir un effet mesurable sur l'expression des gènes de pluripotence dans les rbESCs stabilisées en culture.

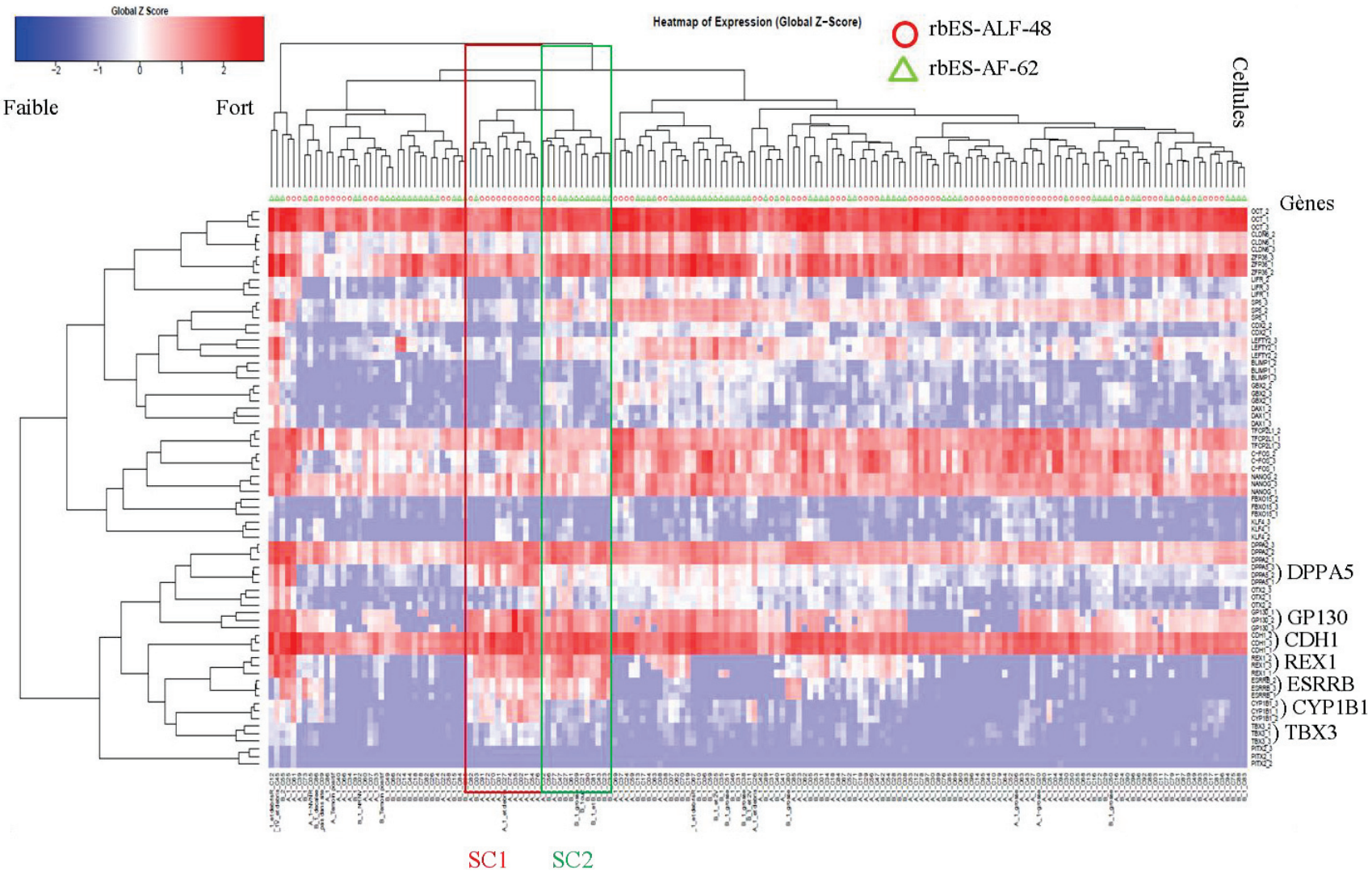


Figure 41: Heatmap représentant les deux types de cellules en cluster de cellules et de gènes

SC1 correspond aux cellules exprimant fortement *Esrrb* et est constitué majoritairement des cellules de la lignée rbES-ALF-48. Le SC2 est constitué de cellules de la lignée rbES-AF-62

2.6.2.2 Analyse transcriptomique sur cellule unique

Les résultats précédents peuvent paraître contradictoires puisque selon les gènes considérés, les analyses statistiques de leur expression désignent un type de lignée ou l'autre comme étant plus proche des cellules de l'ICM. En fait ces résultats pourraient s'expliquer par une hétérogénéité des cellules au sein d'une lignée donnée. Il est ainsi possible que les cellules d'une lignée donnée répondent différemment à la stimulation induite par le LIF et que seule une proportion minoritaire de cellules y soit sensible. Pour répondre à cette question, nous avons débuté une analyse comparative des lignées rbES-ALF-A48 et rbES-AF-B62 par RT-qPCR sur cellule unique. Ce travail est réalisé en collaboration avec la plateforme Genotoul de l'INRA de Toulouse. Afin d'augmenter la robustesse de l'analyse, 3 réplicats techniques ont été réalisés par gène analysé, et donc au final l'expression des 32 gènes précédents a été étudiée. La première étape réalisée sur l'appareil Fluidigm C1 a permis d'isoler 89 cellules pour lignée rbES-ALF-A48 et 87 cellules pour la lignée rbES-AF-B62 (Annexes - Figure 43 p193).

Les niveaux d'expression obtenus (Ct) sont présentés sous forme d'une matrice de couleur (heatmap) où chaque cellule est placée en colonne (et représentée par un rond rouge pour la lignée rbES-ALF-A48 ou par un triangle vert pour la lignée rbESC-AL-B62) et chaque réplicat des différents gènes amplifiés est positionné en ligne, les couleurs représentant les niveaux d'expression (du plus faible en bleu au plus fort en rouge) (Figure 41 et Annexes Figure 44 p194 et 45 p195). L'observation de cette matrice de couleur montre l'existence de deux sous-populations SC1 et SC2 représentant respectivement 23% et 16% dans les lignées rbES-ALF-A48 et rbESC-AL-B62. Ces deux sous-populations expriment fortement *Esrrb, Tbx3* et *Rex1* (Figure 37, SC1 et SC2). De plus, la sous-population SC1 de la lignée rbES-ALF-48, exprime fortement *Cyp1b1* et *Dppa5* contraire-ment à la sous-population SC2 de la lignée rbES-AF-62. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment obtenus par RT-qPCR sur les lignées rbESC-ALF et rbESC-AF (Figure 40a p156). On retrouve notamment ces deux derniers gènes dans le groupe de gènes les plus exprimés par les lignées rbESC-ALF.

Cette analyse montre qu'il existe bien une proportion de rbESCs d'environ un quart de la population cellulaire totale, qui exprime plus fortement les gènes représentatifs de l'état naïf de pluripotence chez le lapin. Cette proportion de cellule est plus importante en présence de LIF, tout comme le nombre de gène de l'état naïf spécifiquement exprimé par cette sous-population. Ces résultats seront prochainement confirmés par l'analyse en RT-qPCR sur cellule unique de deux autres lignées (rbES-ALF-A20 et rbES-AF-B3).

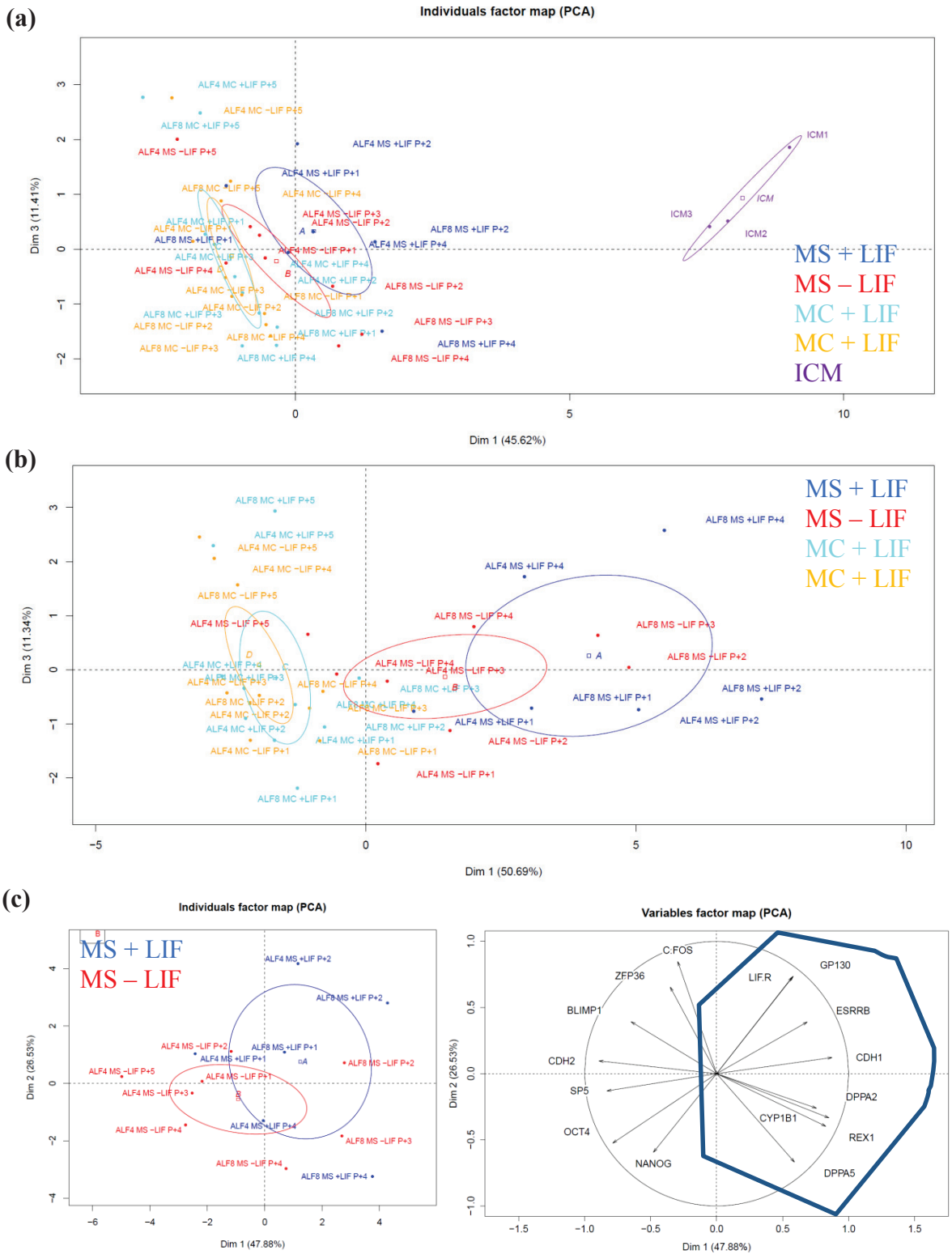


Figure 42: PCA représentant des cultures des lignées rbES-ALF 4 et 8 en matrigel par rapport aux cellules de l'ICM

(MS : milieu standard, MC : milieu conditionné)

(a) PCA avec tous les échantillons comparés avec l'ICM

(b) PCA avec les mêmes échantillons que précédemment sans l'ICM

(c) PCA avec seulement les échantillons en MS avec la représentation des gènes. Cluster bleu comprends les gènes les plus exprimés dans les rbESC-ALF

(d) Courbes de croissance de la lignée rbES-ALF8, dans les différents milieux utilisés

2.6.3 Culture des lignées rbESC-ALF sans MEF

Jusqu'à présent, nous avons toujours dérivé et cultivé des rbESCs sur des cellules nourricières (MEFs traités à la mytomicine), car en leur absence les cellules se différencient très rapidement. Sachant que les MEFs sécrètent de nombreux facteurs de croissance comme le LIF, le FGF et l'Activine et que les lignées rbESC-ALF sont dépendantes de l'Activine et du FGF, j'ai étudié l'influence de ces cellules nourricières sur la culture des lignées rbES-ALF4 et -8. Dans ce but les rbESCs ont été cultivées sur du Matrigel® dans du milieu préalablement conditionné sur des MEFs (MC) ou dans le même milieu non conditionné appelé standard (MS), en présence ou non de LIF. Le Matrigel ® est une matrice chimiquement définis qui mime le rôle des MEFs. Elle est très utilisée pour la culture de lignées d'hESC (Villa-Diaz et al., 2012). Les cellules cultivées en MS avec ou sans LIF se différencient, contrairement aux cellules cultivées en MC. Mais les cellules cultivées en MS expriment les gènes d'intérêt à un niveau plus proche de celui des cellules de l'ICM par rapport aux lignées cultivées en MC (Figure 42a). La comparaison des cellules cultivées en MS ou en MC montre que les lignées cultivées en absence des facteurs apportés par les MEFs sont différentes des cellules bénéficiant de ces facteurs. En revanche, la présence ou l'absence de LIF dans ces milieux n'induit pas de différences significatives entre les lignées dans un milieu donné (les ellipses se recoupent) (Figure 42b). Cependant la comparaison des gènes exprimés dans les lignées cultivées en MS avec ou sans LIF permet de distinguer le même groupe de gène activé par le LIF et précédemment observé, à savoir *Cyp1b1, Dppa5, Dppa2, Gp130, Lifr, Cdh1, Rex1* et *Esrrb* (Figure 42c). En parallèle les deux lignées ont été cultivés avec de l'activine en présence ou en absence de LIF, dans du MS. On peut voir que l'activine seule est capable de maintenir l'autorenouvellement des lignées rbESC-ALF (Figure 42d).

L'ensemble de ces résultats confirme que les rbESCs peuvent se maintenir en culture seulement en présence de MC, c'est à dire en présence de facteurs secrétés par les cellules nourricières, et notamment grâce à l'activine. Contrairement aux cultures de mESCs, le LIF ne peut pas pallier l'absence des MEFs pour les cultures de rbESCs. Mais les rbESCs, bien que dépendantes de l'activine, restent réceptives au LIF puisque l'expression des gènes de pluripotence de ces cellules est modifiée par l'ajout de LIF. Ainsi les gènes activés par le LIF ne sont vraisemblablement pas suffisamment exprimés pour assurer le maintien de la pluripotence de rbESC.

DISCUSSION

« Peut-être nous complairons-nous éternellement
dans les spéculations : la science, elle,
s'occupe activement de ce qui est faisable. »

Stephen Jay Gould
« Quand les poules auront des dents », 1983

3 DISCUSSION

Les premières lignées de cellules rbESCs ont été obtenues en 2008, 10 ans après les premières lignées de cellules hESC. C'est pourquoi elles sont encore très peu documentées. Le travail que j'ai effectué au cours de mon doctorat avait pour objectif de caractériser les cellules rbESCs de manière approfondie. Les cellules rbESCs présentent un grand intérêt par rapport aux cellules mESCs et hESCs. D'une part, l'utilisation des hESCs est soumise à de nombreuses contraintes règlementaires. D'autre part, les mESCs apparaissent comme un cas unique, plutôt qu'un modèle général, de la pluripotence chez les mammifères. Le lapin offre plusieurs avantages.. Sa prolificité est comparable à celle de la souris ce qui permet la production d'embryons en grands nombres. Son élevage est relativement simple et peu coûteux. Enfin, son développement embryonnaire est comparable à celui de l'Homme. Les cellules ESC de lapin apparaissent donc comme un modèle intéressant des cellules ESC de mammifère en générale et de l'Homme en particulier. Dans ce cadre, mon travail de thèse a eu pour objectif d'étudier les cellules rbESCs et de tenter de produire des cellules dans un état naïf de pluripotence.

3.1 La dérivation de rbESCs dépendantes du FGF2

Durant mon stage d'Ecole Pratique des Hautes Etudes, j'ai appris à maîtriser les techniques de dérivation et de culture, puisque j'ai obtenu la première lignée de hESCs de notre laboratoire à partir d'embryons issus de fécondation *in vitro* n'ayant plus de projet parental (Lignée OSCAR référencée à l'Agence de Biomédecine par le n° FE08-088-4). L'application de ces techniques aux embryons de lapin combinée à l'utilisation du milieu de culture publié par l'équipe japonaise de A. Ogura, pionnière de la dérivation des rbESCs (Honda et al., 2008), m'a permis de produire les premières lignées de cellules rbESC dépendantes du FGF2 dans le laboratoire (Osteil et al., 2013). La dérivation de ces lignées de rbESC-FGF m'a également poussé à adapter et améliorer les protocoles de dérivation, de culture et d'analyse de ces lignées. Dorénavant, il est possible d'établir de nombreuses lignées, très rapidement et très efficacement et, de ce fait, de pouvoir tester de nouveaux milieux ou composants qui permettraient d'établir des lignées de rbESC naïves.

La comparaison des lignées de rbESC-FGF avec les lignées de rbiPSC-FGF obtenues par ailleurs dans le laboratoire a montré que seules les cellules rbiPSCs exprimant le marqueur membranaire SSEA1 présentaient des caractères naïfs, à savoir l'expression des gènes de

pluripotence dits naïfs, les caractéristiques de leur cycle cellulaire, l'activité de l'enhancer distal du promoteur du gène *Oct4* murin et la très faible capacité de colonisation d'un embryon receveur. Deux critères séparent les lignées rbiPSCs des lignées rbESCs, d'une part le mode d'obtention avec notamment une reprogrammation qui a pu stabiliser les cellules à un état plus naïf que celui des rbESCs, et d'autre part le mode de dissociation cellulaire. En effet, les rbiPSCs sont dissociées en suspensions unicellulaires après action de la trypsine, alors que les rbESCs sont dissociées en paquets de quelques cellules après action de la collagénase IV. Les résultats obtenus par la suite avec les lignées rbESC-ALF, qui sont cultivées en suspension unicellulaire après action de l'accutase, montrent que ces cellules ont des caractéristiques plus naïves même si elles sont toujours dépendantes du FGF. Il semble donc que le mode de passage en suspension unicellulaire facilite la stabilisation en culture de cellules présentant des propriétés naïves.

3.2 La stabilisation de lignées indépendantes du FGF

Dans le but de produire des lignées de rbESCs naïves, indépendantes du FGF, l'utilisation du milieu 2i/LIF était un premier choix logique puisque ce milieu permet de dériver des lignées d'ESC chez la souris et le rat. Chez la souris, le milieu 2i/LIF a permis de fabriquer des lignées de mESCs à partir de lignées de souris jusque-là réfractaires à la dérivation (Ying et al., 2008). Chez le lapin, malgré de nombreuses tentatives avec l'utilisation d'environ 600 embryons, il s'est avéré impossible de dériver des lignées en milieu 2i/LIF. Ce résultat est toutefois concordant avec les autres tentatives de l'équipe Hongroise d'E. Gocza et de l'équipe japonaise d'A. Honda (communications personnelles non publiées). De plus chez les mammifères autres que la souris, les essais de culture d'ESCs en milieu 2i/LIF sont toujours associés à l'utilisation d'une autre molécule comme la forskoline ou de la surexpression d'un gène de pluripotence, tels que les couples *Oct4* et *Klf4* ou *Klf2* et *Klf4* (Hanna et al., 2010b). Dans la plupart des cas, ces conditions de culture améliorent alors l'état de pluripotence des rbESCs sans pour autant atteindre un état naïf stable. De même la culture de lignées rbiPSC en milieu 2i/LIF n'a pu être possible qu'avec une surexpression d'Oct4 et l'ajout de forskoline (Honda et al., 2013)

Le remplacement du FGF2 par du LIF dans le milieu de culture a toutefois abouti à l'obtention des lignées rbESC-LIF. De plus, l'utilisation d'un mélange de KO-SR + FBS à la place du KO-SR seul d'une part, le passage en suspension unicellulaire par de l'accutase d'autre part, a permis à la dérivation des lignées rbESC-ALF (ALF pour Accutase, LIF et FBS).

Cependant, toutes les lignées cultivées en absence de FGF2 et en présence de LIF se sont avérées être finalement indépendantes de la voie LIF pour leur autorenouvellement. Elles sont en effet toujours dépendantes des voies FGF et activine, probablement par le biais des cellules nourricières. Il est effectivement connu que les MEFs produisent différents facteurs de croissance dont notamment l'activine (Rathjen et al., 1990). De plus, les rbESC-ALF se différencient en absence de MEFs ou de milieu conditionné par les MEFs. Seul l'ajout d'activine permet de maintenir ces cellules à l'état indifférencié. Par ailleurs, une équipe a montré que le LIF était bénéfique à la dérivation de lignée de rbESCs, le taux de dérivation passant de 0 (sans LIF) à 20% (Intawicha et al., 2009). Cette même équipe a montré que le LIF et le FGF agissait conjointement pour maintenir la pluripotence des rbESCs (Hsieh et al., 2011). En revanche, l'équipe d'A. Ogura a montré que seuls le FGF et l'activine étaient nécessaires au maintien des cellules rbESCs en culture (Honda et al., 2009). Ces résultats semblent contradictoires mais le point commun entre tous ces travaux est l'utilisation de cellules nourricières, qui maintiennent l'autorenouvellement des cellules, ce qui peut induire des biais dans l'analyse des voies de signalisation.

3.3 L'instabilité génétique des lignées rbESC-ALF

Nous avons observé que les lignées obtenues en présence de LIF et dissociées en suspensions unicellulaires à l'aide d'accutase présentaient souvent un nombre anormal de chromosome dès leur dérivation (lignées rbESC-ALF6, -10 et -12) ou acquéraient un caryotype anormal lors de leur culture (lignées rbESC-ALF2, -4 et -8). De telles modifications ont également été observées dans les cultures d'hESCs (Draper et al., 2004; Lefort et al., 2008) et sont souvent associées à un avantage de croissance des cellules en culture et a une indépendance au facteur de transcription (Ben-David and Benvenisty, 2011). Bien que les modifications acquises par les lignées rbESC-ALF n'aient pas été spécifiquement caractérisées, celles-ci apportent un avantage de croissance aux cellules comme en témoignent leur vitesse de croissance qui augmente après le passage 10 et leur profil d'expression génique qui tend vers celui des cellules naïves au fur et à mesure des passages. Cette instabilité génétique révèle également l'inaptitude du milieu de culture utilisé à stabiliser les cellules dans un état de pluripotence donné. Une adaptation des conditions de culture apparaît donc indispensable pour pouvoir utiliser les lignées de rbESC en transgénèse, car d'une part des cellules ayant un caryotype anormal ne pourront pas coloniser la lignée germinale d'embryons receveurs, et

d'autre part ces cellules ne peuvent pas être utilisées pour des raisons éthiques dans le but de produire des animaux chimères.

3.4 Les caractéristiques naïves des rbESC-ALF

Malgré leur non dépendance au LIF, les lignées rbESC-ALF présentent plusieurs caractéristiques de cellules naïves en comparaison des lignées rbESC-FGF. Leur culture est plus homogène avec peu de différenciation, mais elles forment toujours des colonies plates, à la manière des hESCs et rbESC-FGF, et non des colonies en dôme comme les mESCs. Elles prolifèrent aussi plus rapidement et présentent un cycle cellulaire caractéristique des PSCs, avec en particulier une diminution de la proportion de cellules en phase G1. Contrairement aux lignées rbESC-FGF, on observe une expression de certains marqueurs de pluripotence associés à l'état naïf tels que *Rex1, Tbx3, Blimp1, Esrrb* et *Dazl*. Enfin, elles sont capables de coloniser un blastocyste receveur avec un taux d'environ 15% alors que les rbESC-FGF en sont incapables. De telles lignées de rbESCs, présentant des caractéristiques de cellules naïves, n'ont encore jamais été décrites dans la littérature. Les lignées publiées par d'autres équipes sont incapables de coloniser un blastocyste receveur (Honda et al. 2008). On peut supposer que le LIF induit des propriétés spécifiques aux ESCs naïves, même si les lignées rbESC-ALF n'utilisent pas la voie de signalisation LIF/Stat3 pour l'autorenouvellement.

3.5 Le rôle du LIF dans la dérivation des lignées rbESC-ALF

Nous avons observés que l'efficacité de dérivation des lignées de rbESC diminuait lorsque les ICMs étaient cultivées en présence de LIF. Ce résultat va à l'encontre des données obtenues chez la souris où la pluripotence des mESCs est maintenue par le LIF. Le LIF active trois voies de signalisation. Les deux premières, les voies LIF/STAT3 et LIF/PI3K, stimulent l'autorenouvellement. La troisième voie, la voie des MAPKs, favorise la différenciation des cellules (Niwa et al., 2009). L'équilibre entre ces trois voies de signalisation permet aux cellules pluripotentes murines de s'autorenouveller à l'état indifférencié, et de s'engager rapidement dans la différenciation lorsqu'un stimulus leur est présenté. *In vivo*, il s'établit également un équilibre entre l'autorenouvellement et la différenciation des cellules souches embryonnaires. Lorsque nous isolons les ESCs, nous bloquons artificiellement en culture ce mécanisme naturel. Lors de la dérivation des rbESCs, il est donc possible que les voies stimulant

l'autorenouvellement ne soient pas activées efficacement, comme c'est le cas pour la voie LIF/STAT3 dans les cellules hESCs (Daheron et al., 2004), et qu'en contrepartie la voie des MAPKs soit stimulée entrainant ainsi la différenciation des cellules. Ce déséquilibre pourrait entrainer la diminution de l'efficacité de dérivation des lignées de rbESCs observée en présence de LIF. Ce résultat est cependant contradictoire avec les données de l'équipe de Ju (Intawicha et al., 2009) qui montrent une effet facilitateur du LIF dans la dérivation de rbESCs en présence de FGF2 (Hsieh et al., 2011). Cependant ils utilisent du LIF murin à la différence de notre laboratoire qui utilise du LIF humain.

3.6 Le rôle du LIF dans le contrôle de la pluripotence des lignées rbESC-ALF

Malgré leurs caractéristiques plus naïves, la prolifération des lignées rbESC-ALF reste dépendante de l'Activine et du FGF. En effet les cellules peuvent se maintenir à l'état indifférencié sur Matrigel en absence de MEFs, uniquement si on ajoute de l'Activine au milieu de culture, ou si on utilise du milieu de culture préalablement conditionné par des MEFs. Cependant, le LIF semble tout de même avoir un effet sur les cellules puisque les cellules cultivées en présence de LIF ont un profil d'expression génique différent de celui des cellules cultivées sans LIF. Plus précisément, le transcriptome des cellules dérivées en absence de LIF est plus proche de celui des cellules de l'ICM. L'analyse des lignées par qPCR sur cellule unique montre que 25% des cellules cultivées en présence de LIF (rbESC-ALF) expriment les gènes *Cyp1b1* et *Dppa5,* gènes dont l'expression est élevée dans l'ICM de lapin. Les cellules rbESC-ALF sont donc réceptives au LIF mais ne semblent pas pouvoir se maintenir en autorenouvellement sans la présence de MEFs. Les MEFs elles-mêmes pourraient être une source de LIF pour les cellules rbESCs. On sait en effet que les MEFs produisent du LIF sous forme matricielle (Rathjen et al., 1990). De même, on a décrit qu'une faible concentration de LIF avait un effet positif sur l'efficacité de dérivation des lignées de cellules ESC chez la vache. Une forte concentration, ou une absence de LIF, étaient au contraire délétères (Muzaffar et al., 2012). Notons que les MEFs ont un rôle controversé dans la dérivation des ESCs naïves : les mESCs naïves peuvent être cultivées en absence de MEFs alors que les hESCs amorcées nécessitent des MEFs. Il apparaît évident que les voies de signalisation qui maintiennent les états naïf et amorcé sont antagonistes. Lorsqu'on ajoute du LIF aux cultures de rbESCs sur MEFs, les cellules répondent à ce nouveau stimulus, mais conservent leur capacité à répondre efficacement à l'Activine et au FGF sécrétés par les cellules nourricières. La diminution de

l'efficacité de dérivation en présence de LIF d'une part, le transcriptome des cellules rbESCs dérivées en absence de LIF plus proche de celui des cellules de l'ICM d'autre part, peuvent s'expliquer par cet antagonisme des voies de signalisation. Pour améliorer l'efficacité de dérivation et l'état de pluripotence des rbESCs en présence de LIF, il faudrait établir des conditions de culture permettant leur culture sans MEFs.

3.7 Perspectives

Au vu de nos résultats, plusieurs stratégies peuvent être envisagées afin d'obtenir des cellules rbESCs naïves capables de produire des chimères somatiques et germinales.

La première stratégie vise à identifier les conditions de culture permettant de s'affranchir des MEFs. L'absence de MEFs priverait les cellules pluripotentes des signaux cellulaires qui induisent les voies de signalisation spécifiques de la pluripotence amorcée. C'est, à mon sens, l'obstacle le plus difficile à surmonter. Toutes nos tentatives de dérivation de lignées de rbESCs sur Matrigel ou sur fibronectine ont été infructueuses. En moyenne, 90% des ICMs adhèrent et se développent lorsqu'ils sont placés sur des MEFs. Cette efficacité tombe à environ 30% en présence de Matrigel ou sur fibronectine. De plus, les ICMs adhèrent mais ne se développent pas. Ainsi, on peut imaginer que les MEFs sont indispensables à la première phase d'adhésion car, outre les facteurs de croissances qu'elles sécrètent, elles génèrent des sites d'attachement pour les ESCs. Une solution pourrait être alors d'ensemencer les ICMs sur des MEFs pour le premier passage, puis de les transférer sur Matrigel aux passages suivants. Cependant on peut supposer que ce premier passage en présence de MEFs soit suffisamment long pour que les rbESCs se stabilisent au stade amorcé. Dans ce cas, on peut aussi envisager de bloquer les voies Activine et FGF engendrées par les MEFs, en utilisant des inhibiteurs de ces signaux cellulaires.

La deuxième stratégie a pour but de stimuler la voie de signalisation LIF/STAT3. Dans ce but, on peut envisager d'utiliser un LIF d'une autre espèce. En effet, dans toutes les expériences décrites dans ce manuscrit, nous avons utilisé du LIF humain produit en culture dans notre laboratoire et utilisé aussi pour les cultures des cellules mESCs. Il est possible que le LIF humain ne soit pas suffisamment efficace pour la dérivation de lignées naïves chez le lapin. En effet, une équipe a récemment montré que le LIF de lapin était plus efficace pour maintenir les cellules rbESCs en culture que les LIFs murin ou humain (Xue et al., 2012). Par ailleurs, l'équipe de Z. Bösze a montré que l'expression du LIFR, le récepteur du LIF, diminuait lors des premiers jours de dérivation. En revanche, l'ajout de LIF au milieu de culture permettait

de ralentir cette la cinétique de cette extinction (Catunda et al., 2008). Ce résultat suggère à nouveau que la stimulation de la voie de signalisation du LIF est indispensable. Pour contourner la perte d'expression du LIFR, on peut envisager d'utiliser une combinaison d'Inteleukine 6 (IL6 ; une interleukine de la même famille que le LIF) et de son récepteur soluble (IL6R) (Ihle, 1995; Stahl et al., 1995). En effet, l'IL6R sous l'influence de l'IL6 se lie à gp130 et le récepteur hétérodimérique ainsi formé recrute les JAKs et active STAT3. De plus, nous avons vu précédemment que les lignées rbESC-ALF étaient réceptives au LIF sans que ce dernier stimule pour autant leur l'autorenouvellement. Ce phénomène pourrait résulter d'un déséquilibre de l'action des trois voies induites par le LIF en faveur de la voie des MAPKs qui sont plus impliquées dans la différenciation des mESCs (Burdon et al., 1999). Pour éviter ce déséquilibre, on peut envisager d'utiliser une forme mutante de gp130, qui comporte la transformation d'une tyrosine en phenylalanine en position 118 (Y118F). Cette mutation empêche le recrutement de SHP2 au récepteur et l'activation subséquente de la voie des MAPKs. Un tel récepteur chimérique, composé du site de fixation au GCSF (Granulocytes Colony-Stimuling Factor) et de la partie intracellulaire de la gp130 mutée (mutation Y118F du site de fixation de SHP2), stimule très efficacement l'autorenouvellement de cellules mESCs car, dans ce ca,s la voie des MAPK n'est pas stimulées (Burdon et al., 1999)

La troisième stratégie vise à activer la voie de signalisation du LIF dans l'embryon précoce, préalablement à la dérivation des lignées de cellules rbESCs. En effet, le phénomène de diapause n'existant pas chez le lapin, il se pourrait que lors de l'évolution, cette espèce ait perdu les mécanismes de réponse au LIF. Il est cependant possible d'induire une diapause chez des espèces qui en sont dépourvus par transplantation des embryons précoces dans le tractus génital de souris. L'équipe de P. Loi a ainsi induit une diapause chez des embryons de brebis (Ptak et al., 2012). On peut donc envisager d'induire la diapause d'embryons de lapin en les transférant dans le tractus génital de souris.

La quatrième stratégie repose sur une logique différente. Dans un premier temps, nous devons approfondir notre connaissance des voies de signalisation qui régulent l'autorenouvellement des cellules souches pluripotentes dans l'ICM de l'embryon de lapin. Ce type d'étude implique vraisemblablement une analyse approfondie du transcriptome de l'embryon de lapin. Les premiers travaux réalisés sur l'embryon humain suggèrent que les voies de signalisation de l'IGF1, ou de certaines neurotrophines comme le BDNF, pourraient jouer un rôle dans la prolifération des cellules souches pluripotentes dans l'embryon pre-implantatoire (Kawamura et al., 2012). Dans un deuxième temps, il conviendra d'étudier si ces

facteurs de croissance, isolés ou en combinaison, sont capables de stimuler l'autorenouvellement des cellules de l'ICM et l'établissement de lignées de cellules rbESCs.

Toutes ces stratégies, seules ou vraisemblablement combinées, permettront sans doute d'obtenir à court terme des lignées de rbESCs naïves capables de coloniser un embryon receveur. Mon travail de thèse a permis d'améliorer grandement les techniques de dérivation d'ESCs chez le lapin et d'obtenir des informations sur la pluripotence de ces cellules indispensables à l'établissement de lignées naïves.

BIBLIOGRAPHIE

« La recherche a besoin d'argent dans deux domaines prioritaires :
le cancer et les missiles antimissiles.
Pour les missiles antimissiles, il y a les impôts.
Pour le cancer, on fait la quête. »
Pierre Desproges (1939 – 1988)

4 BIBLIOGRAPHIE

Adams, C.E. (1958). Egg development in the rabbit: the influence of post-coital ligation of the uterine tube and of ovariectomy. The Journal of Endocrinology *16*, 283–293.

Al-Gubory, K.H., and Houdebine, L.-M. (2006). In vivo imaging of green fluorescent protein-expressing cells in transgenic animals using fibred confocal fluorescence microscopy. European Journal of Cell Biology *85*, 837–845.

Amano, H., Itakura, K., Maruyama, M., Ichisaka, T., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2006). Identification and targeted disruption of the mouse gene encoding ESG1 (PH34/ECAT2/DPPA5). BMC Developmental Biology *6*, 11.

Ambros, V., and Horvitz, H.R. (1984). Heterochronic mutants of the nematode Caenorhabditis elegans. Science (New York, N.Y.) *226*, 409–416.

Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev Biol *227*, 271–278.

Amps, K., Andrews, P.W., Anyfantis, G., Armstrong, L., Avery, S., Baharvand, H., Baker, J., Baker, D., Munoz, M.B., Beil, S., et al. (2011). Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. Nature Biotechnology *29*, 1132–1144.

Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Juhr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., et al. (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. Cell Stem Cell *8*, 376–388.

Augui, S., Nora, E.P., and Heard, E. (2011). Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. Nature Reviews. Genetics *12*, 429–442.

Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. Genes & Development *22*, 2773–2785.

Bai, Q., Desprat, R., Klein, B., Lemaître, J.-M., and De Vos, J. (2013). Embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells? A DNA integrity perspective. Current Gene Therapy *13*, 93–98.

Bao, S., Tang, F., Li, X., Hayashi, K., Gillich, A., Lao, K., and Surani, M.A. (2009). Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. Nature *461*, 1292–1295.

Barroso-delJesus, A., Lucena-Aguilar, G., Sanchez, L., Ligero, G., Gutierrez-Aranda, I., and Menendez, P. (2011). The Nodal inhibitor Lefty is negatively modulated by the microRNA miR-302 in human embryonic stem cells. FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *25*, 1497–1508.

Beattie, G.M., Lopez, A.D., Bucay, N., Hinton, A., Firpo, M.T., King, C.C., and Hayek, A. (2005). Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. Stem Cells *23*, 489–495.

Becker, K.A., Ghule, P.N., Therrien, J.A., Lian, J.B., Stein, J.L., Van Wijnen, A.J., and Stein, G.S. (2006). Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. Journal of Cellular Physiology *209*, 883–893.

Ben-David, U., and Benvenisty, N. (2011). The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. Nature Reviews. Cancer *11*, 268–277.

Berg, D.K., Smith, C.S., Pearton, D.J., Wells, D.N., Broadhurst, R., Donnison, M., and Pfeffer, P.L. (2011). Trophectoderm lineage determination in cattle. Developmental Cell *20*, 244–255.

Van den Berg, D.L.C., Zhang, W., Yates, A., Engelen, E., Takacs, K., Bezstarosti, K., Demmers, J., Chambers, I., and Poot, R.A. (2008). Estrogen-related receptor beta interacts with Oct4 to positively regulate Nanog gene expression. Molecular and Cellular Biology *28*, 5986–5995.

Betschinger, J., Nichols, J., Dietmann, S., Corrin, P.D., Paddison, P.J., and Smith, A. (2013). Exit from Pluripotency Is Gated by Intracellular Redistribution of the bHLH Transcription Factor Tfe3. Cell *153*, 335–347.

Blomberg, I., and Hoffmann, I. (1999). Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. Molecular and Cellular Biology *19*, 6183–6194.

Bourillot, P.Y., Aksoy, I., Schreiber, V., Wianny, F., Schulz, H., Hummel, O., Hubner, N., and 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*, 1760–1771.

Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature *309*, 255–256.

Brinster, R.L. (1974). The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. J Exp Med *140*, 1049–1056.

Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. Nature *448*, 191–195.

Buehr, M., and Smith, A. (2003). Genesis of embryonic stem cells. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences *358*, 1397–402; discussion 1402.

Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q.L., and Smith, A. (2008). Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. Cell *135*, 1287–1298.

Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., and Smith, a (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. Developmental Biology *210*, 30–43.

Byrne, J.A., Pedersen, D.A., Clepper, L.L., Nelson, M., Sanger, W.G., Gokhale, S., Wolf, D.P., and Mitalipov, S.M. (2007). Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. Nature *450*, 497–502.

Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., and Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. Development (Cambridge, England) *132*, 885–896.

Catunda, A.P., Gócza, E., Carstea, B. V, Hiripi, L., Hayes, H., Rogel-Gaillard, C., Bertaud, M., and Bosze, Z. (2008). Characterization, chromosomal assignment, and role of LIFR in early embryogenesis and stem cell establishment of rabbits. Cloning and Stem Cells *10*, 523–534.

Challah-Jacques, M., Chesne, P., and Renard, J.P. (2003). Production of cloned rabbits by somatic nuclear transfer. Cloning and Stem Cells *5*, 295–299.

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.

Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. Nature *450*, 1230–1234.

Chang, K.-H., and Li, M. (2013). Clonal isolation of an intermediate pluripotent stem cell state. Stem Cells (Dayton, Ohio) *31*, 918–927.

Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M.W., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. Nature *465*, 584–589.

Chen, A.E., Egli, D., Niakan, K., Deng, J., Akutsu, H., Cowan, C., Fitz-gerald, C., Zhang, K., Melton, D.A., and Eggan, K. (2012a). Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines. *4*, 103–106.

Chen, C.-H., Chang, W.-F., Liu, C.-C., Su, H.-Y., Shyue, S.-K., Cheng, W.T.K., Chen, Y.E., Wu, S.-C., Du, F., Sung, L.-Y., et al. (2012b). Spatial and temporal distribution of Oct-4 and acetylated H4K5 in rabbit embryos. Reproductive Biomedicine Online *24*, 433–442.

Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature *436*, 740–744.

Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/β-catenin signaling and disease. Cell *149*, 1192–1205.

Cockburn, K., and Rossant, J. (2010). Making the blastocyst : lessons from the mouse. *120*.

Coronado, D., Godet, M., Bourillot, P.-Y., Tapponnier, Y., Bernat, A., Petit, M., Afanassieff, M., Markossian, S., Malashicheva, A., Iacone, R., et al. (2013). A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. Stem Cell Research *10*, 118–131.

Costanzi, C., and Pehrson, J.R. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. Nature *393*, 599–601.

Daheron, L., Opitz, S.L., Zaehres, H., Lensch, M.W., Andrews, P.W., Itskovitz-Eldor, J., and Daley, G.Q. (2004). LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. Stem Cells *22*, 770–778.

Darr, H., Mayshar, Y., and Benvenisty, N. (2006). Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. Development *133*, 1193–1201.

Davenport, T.G., Jerome-Majewska, L.A., and Papaioannou, V.E. (2003). Mammary gland, limb and yolk sac defects in mice lacking Tbx3, the gene mutated in human ulnar mammary syndrome. Development (Cambridge, England) *130*, 2263–2273.

Dhara, S.K., and Benvenisty, N. (2004). Gene trap as a tool for genome annotation and analysis of X chromosome inactivation in human embryonic stem cells. Nucleic Acids Research *32*, 3995–4002.

Doetschman, T., Gregg, R.G., Maeda, N., Hooper, M.L., Melton, D.W., Thompson, S., and Smithies, O. (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. Nature *330*, 576–578.

Donohoe, M.E., Silva, S.S., Pinter, S.F., Xu, N., and Lee, J.T. (2009). The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctcf and also controls X-chromosome pairing and counting. Nature *460*, 128–132.

Draper, J.S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H.D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., and Andrews, P.W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. Nature Biotechnology *22*, 53–54.

Du, J., Chen, T., Zou, X., Xiong, B., and Lu, G. (2010). Dppa2 knockdown-induced differentiation and repressed proliferation of mouse embryonic stem cells. Journal of Biochemistry *147*, 265–271.

Duval, D., Reinhardt, B., Kedinger, C., and Boeuf, H. (2000). Role of suppressors of cytokine signaling (Socs) in leukemia inhibitory factor (LIF) -dependent embryonic stem cell survival. FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *14*, 1577–1584.

Edwards, R.G., Purdy, J.M., Steptoe, P.C., and Walters, D.E. (1981). The growth of human preimplantation embryos in vitro. American Journal of Obstetrics and Gynecology *141*, 408–416.

Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., and Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. Stem Cells *26*, 2467–2474.

Evans, and Kaufman (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.

Fan, J., and Watanabe, T. (2003). Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. Pharmacology & Therapeutics *99*, 261–282.

Fang, J., Chen, T., Chadwick, B., Li, E., and Zhang, Y. (2004). Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. The Journal of Biological Chemistry *279*, 52812–52815.

Fang, Z.F., Gai, H., Huang, Y.Z., Li, S.G., Chen, X.J., Shi, J.J., Wu, L., Liu, A., Xu, P., and Sheng, H.Z. (2006). Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos. Experimental Cell Research *312*, 3669–3682.

Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V.E., DeChiara, T.M., and Goldfarb, M. (1995). Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. Science (New York, N.Y.) *267*, 246–249.

Feng, B., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.H., Heng, J.C., Chan, Y.S., Yaw, L.P., Zhang, W., Loh, Y.H., Han, J., et al. (2009). Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. Nat Cell Biol *11*, 197–203.

Festuccia, N., Osorno, R., Halbritter, F., Karwacki-Neisius, V., Navarro, P., Colby, D., Wong, F., Yates, A., Tomlinson, S.R., and Chambers, I. (2012). Esrrb Is a Direct Nanog Target Gene that Can Substitute for Nanog Function in Pluripotent Cells. Cell Stem Cell *11*, 477–490.

Fluckiger, A.-C., Marcy, G., Marchand, M., Négre, D., Cosset, F.-L., Mitalipov, S., Wolf, D., Savatier, P., and Dehay, C. (2006). Cell cycle features of primate embryonic stem cells. Stem Cells (Dayton, Ohio) *24*, 547–556.

Fong, H., Hohenstein, K.A., and Donovan, P.J. (2008). Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. Stem Cells *26*, 1931–1938.

Gachelin, G., Kemler, R., Kelly, F., and Jacob, F. (1977). PCC4, a new cell surface antigen common to multipotential embryonal carcinoma cells, spermatozoa, and mouse early embryos. Dev Biol *57*, 199–209.

Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in Biotechnology *31*, 397–405.

Galaktionov, K., and Beach, D. (1991). Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. Cell *67*, 1181–1194.

Giles, J.R., Yang, X., Mark, W., and 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. Molecular Reproduction and Development *36*, 130–138.

Greber, B., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2007). Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. Stem Cells *25*, 455–464.

Greber, B., Wu, G., Bernemann, C., Joo, J.Y., Han, D.W., Ko, K., Tapia, N., Sabour, D., Sterneckert, J., Tesar, P., et al. (2010). Conserved and divergent roles of FGF signaling in mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells. Cell Stem Cell *6*, 215–226.

Gurdon, J., Elsdale, T., and Fischberg, M. (1958). Nuclei, Sexually Mature Individuals of Xenopus laevis from the Transplantation of Single Somatic. Nature.

Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., Morfopoulou, S., Humphreys, P., Mansfield, W., Walker, R., et al. (2009). Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. Cell Stem Cell *5*, 597–609.

Han, D.W., Tapia, N., Joo, J.Y., Greber, B., Araúzo-Bravo, M.J., Bernemann, C., Ko, K., Wu, G., Stehling, M., Do, J.T., et al. (2010a). Epiblast stem cell subpopulations represent mouse embryos of distinct pregastrulation stages. Cell *143*, 617–627.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., and Kim, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell *125*, 887–901.

Han, J., Yuan, P., Yang, H., Zhang, J., Soh, B.S., Li, P., Lim, S.L., Cao, S., Tay, J., Orlov, Y.L., et al. (2010b). Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells. Nature *463*, 1096–1100.

Hanna, J., Cheng, A.W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C.J., Soldner, F., Cassady, J.P., Muffat, J., Carey, B.W., and Jaenisch, R. (2010a). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. Proc Natl Acad Sci U S A.

Hanna, J., Cheng, A.W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C.J., and Soldner, F. (2010b). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. PNAS 1–6.

Harrison, K.B., and Warburton, D. (1986). Preferential X-chromosome activity in human female placental tissues. Cytogenetics and Cell Genetics *41*, 163–168.

He, L., and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nature Reviews. Genetics *5*, 522–531.

Honda, A., Hirose, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Shimozawa, N., Hatori, M., Shimizu, N., Murata, T., and Hirose, M. (2008). Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. Reproductive BioMedicine Online *17*, 706–715.

Honda, A., Hirose, M., and Ogura, A. (2009). Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. Exp Cell Res *315*, 2033–2042.

Honda, A., Hirose, M., Hatori, M., Matoba, S., Miyoshi, H., Inoue, K., and Ogura, A. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. The Journal of Biological Chemistry *285*, 31362–31369.

Honda, A., Hatori, M., Hirose, M., Honda, C., Izu, H., Inoue, K., Hirasawa, R., Matoba, S., Togayachi, S., Miyoshi, H., et al. (2013). Naive-like conversion overcomes the limited differentiation capacity of induced pluripotent stem cells. The Journal of Biological Chemistry.

Hondo, E., and Stewart, C.L. (2005). Profiling gene expression in growth-arrested mouse embryos in diapause. Genome Biology *6*, 202.

Hotta, A., Cheung, A.Y., Farra, N., Vijayaragavan, K., Seguin, C.A., Draper, J.S., Pasceri, P., Maksakova, I.A., Mager, D.L., Rossant, J., et al. (2009). Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. Nat Methods *6*, 370–376.

Hovatta, O. (2003). A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. Human Reproduction *18*, 1404–1409.

Hsieh, Y.-C., Intawicha, P., Lee, K.-H., Chiu, Y.-T., Lo, N.-W., and Ju, J.-C. (2011). LIF and FGF cooperatively support stemness of rabbit embryonic stem cells derived from parthenogenetically activated embryos. Cellular Reprogramming *13*, 241–255.

Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D. a (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. Nature Biotechnology *26*, 1269–1275.

Hyslop, L., Stojkovic, M., Armstrong, L., Walter, T., Stojkovic, P., Przyborski, S., Herbert, M., Murdoch, A., Strachan, T., and Lako, M. (2005). Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. Stem Cells *23*, 1035–1043.

Ihle, J.N. (1995). Cytokine receptor signalling. Nature *377*, 591–594.

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., et al. (2009). Characterization of embryonic stem cell lines derived from New Zealand white rabbit embryos. Cloning and Stem Cells *11*, 27–38.

Ivanova, N., Dobrin, R., Lu, R., Kotenko, I., Levorse, J., DeCoste, C., Schafer, X., Lun, Y., and Lemischka, I.R. (2006). Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. Nature *442*, 533–538.

James, D., Levine, A.J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. Development (Cambridge, England) *132*, 1273–1282.

Van der Jeught, M., O'Leary, T., Ghimire, S., Lierman, S., Duggal, G., Versieren, K., Deforce, D., Chuva de Sousa Lopes, S., Heindryckx, B., and De Sutter, P. (2013). The combination of inhibitors of FGF MEK Erk and GSK3β signaling increases the number of OCT4 and NANOG positive cells in the human ICM.pdf. Stem Cells and Development.

Jiang, J., Chan, Y.-S., Loh, Y.-H., Cai, J., Tong, G.-Q., Lim, C.-A., Robson, P., Zhong, S., and Ng, H.-H. (2008). A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. Nature Cell Biology *10*, 353–360.

Jones, S.M., and Kazlauskas, A. (2001). Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. Nature Cell Biology *3*, 165–172.

Jonkers, I., Barakat, T.S., Achame, E.M., Monkhorst, K., Kenter, A., Rentmeester, E., Grosveld, F., Grootegoed, J.A., and Gribnau, J. (2009). RNF12 is an X-Encoded dose-dependent activator of X chromosome inactivation. Cell *139*, 999–1011.

Jouneau, A., Ciaudo, C., Sismeiro, O., Brochard, V., Jouneau, L., Vandormael-Pournin, S., Coppée, J.-Y., Zhou, Q., Heard, E., Antoniewski, C., et al. (2012). Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles. RNA (New York, N.Y.) *18*, 253–264.

Kahan, B.W., and Ephrussi, B. (1970). Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. J Natl Cancer Inst *44*, 1015–1036.

Kamachi, Y., Uchikawa, M., and Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. Trends in Genetics : TIG *16*, 182–187.

Kanda, A., Sotomaru, Y., Shiozawa, S., and Hiyama, E. (2012). Establishment of ES cells from inbred strain mice by dual inhibition (2i). The Journal of Reproduction and Development *58*, 77–83.

Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M., and Rajewsky, K. (2005). Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. Genes & Development *19*, 489–501.

Kawamura, K., Chen, Y., Shu, Y., Cheng, Y., Qiao, J., Behr, B., Pera, R.A.R., and Hsueh, A.J.W. (2012). Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth in vitro using autocrine/paracrine growth factors. PloS One *7*, e49328.

Keller, G.M. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. Curr Opin Cell Biol *7*, 862–869.

Keohane, A.M., O'neill, L.P., Belyaev, N.D., Lavender, J.S., and Turner, B.M. (1996). X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. Developmental Biology *180*, 618–630.

Khalil, A.M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Rivea Morales, D., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B.E., Van Oudenaarden, A., et al. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 11667–11672.

Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., and Orkin, S.H. (2008). An Extended Transcriptional Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells. Cell *132*, 1049–1061.

Kim, M.-H., Yuan, X., Okumura, S., and Ishikawa, F. (2002). Successful inactivation of endogenous Oct-3/4 and c-mos genes in mouse preimplantation embryos and oocytes using short interfering RNAs. Biochemical and Biophysical Research Communications *296*, 1372–1377.

Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. Nature Reviews. Molecular Cell Biology *10*, 126–139.

Kirchhof, N., Carnwath, J.W., Lemme, E., Anastassiadis, K., Schöler, H., and Niemann, H. (2000). Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. Biology of Reproduction *63*, 1698–1705.

Kleinsmith, L.J., and Pierce, B.J. (1964). Multipotentiality of single embryonal Carcinoma cells. October *24*, 1544.

Knowles, B.B., Aden, D.P., and Solter, D. (1978). Monoclonal antibody detecting a stage-specific embryonic antigen (SSEA-1) on preimplantation mouse embryos and teratocarcinoma cells. Curr Top Microbiol Immunol *81*, 51–53.

Kobolak, J., Kiss, K., Polgar, Z., Mamo, S., Rogel-Gaillard, C., Tancos, Z., Bock, I., Baji, A.G., Tar, K., Pirity, M.K., et al. (2009). Promoter analysis of the rabbit POU5F1 gene and its expression in preimplantation stage embryos. BMC Molecular Biology *10*, 88.

Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. Biochem J *351 Pt 2*, 289–305.

Koledova, Z., Kafkova, L.R., Calabkova, L., Krystof, V., Dolezel, P., and Divoky, V. (2010). Cdk2 inhibition prolongs G1 phase progression in mouse embryonic stem cells. Stem Cells and Development *19*, 181–194.

Kopp, J.L., Ormsbee, B.D., Desler, M., and Rizzino, A. (2008). Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. Stem Cells *26*, 903–911.

Kuijk, E.W., Du Puy, L., Van Tol, H.T. a, Oei, C.H.Y., Haagsman, H.P., Colenbrander, B., and Roelen, B. a J. (2008). Differences in early lineage segregation between mammals. Developmental Dynamics : an Official Publication of the American Association of Anatomists *237*, 918–927.

Kunath, T., Saba-El-Leil, M.K., Almousailleakh, M., Wray, J., Meloche, S., and Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. Development (Cambridge, England) *134*, 2895–2902.

Kurosaka, S., Eckardt, S., and McLaughlin, K.J. (2004). Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct4 transcript localization. Biology of Reproduction *71*, 1578–1582.

Léandri, R.D., Archilla, C., Bui, L.C., Peynot, N., Liu, Z., Cabau, C., Chastellier, A., Renard, J.P., and Duranthon, V. (2009). Revealing the dynamics of gene expression during embryonic genome activation and first differentiation in the rabbit embryo with a dedicated array screening. Physiological Genomics *36*, 98–113.

Lee, J.T. (2000). Disruption of imprinted X inactivation by parent-of-origin effects at Tsix. Cell *103*, 17–27.

Lee, J.T., Davidow, L.S., and Warshawsky, D. (1999). Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. Nature Genetics *21*, 400–404.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell *75*, 843–854.

Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Féraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. Nature Biotechnology *26*, 1364–1366.

Li, M.A., and He, L. (2012). microRNAs as novel regulators of stem cell pluripotency and somatic cell reprogramming. BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology *34*, 670–680.

Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R.E., Schulze, E.N., Song, H., Hsieh, C.-L., et al. (2008). Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. Cell *135*, 1299–1310.

Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H.J., Yoder, M.C., and Chan, R.J. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. Blood *105*, 635–637.

Li, Z., Yang, C.-S., Nakashima, K., and Rana, T.M. (2011). Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. The EMBO Journal *30*, 823–834.

Lipchina, I., Elkabetz, Y., Hafner, M., Sheridan, R., Mihailovic, A., Tuschl, T., Sander, C., Studer, L., and Betel, D. (2011). Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for miR-302 in modulating BMP response. Genes & Development *25*, 2173–2186.

Liu, H., Zhu, F., Yong, J., Zhang, P., Hou, P., Li, H., Jiang, W., Cai, J., Liu, M., Cui, K., et al. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. Cell Stem Cell *3*, 587–590.

Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. Science (New York, N.Y.) *303*, 95–98.

Luo, J., Sladek, R., Bader, J.A., Matthyssen, A., Rossant, J., and Giguère, V. (1997). Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta. Nature *388*, 778–782.

Lyashenko, N., Winter, M., Migliorini, D., Biechele, T., Moon, R.T., and Hartmann, C. (2011). Differential requirement for the dual functions of β-catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation. Nature Cell Biology *13*, 753–761.

Lyon, M.F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.). Nature *190*, 372–373.

Lyssiotis, C.A., Foreman, R.K., Staerk, J., Garcia, M., Mathur, D., Markoulaki, S., Hanna, J., Lairson, L.L., Charette, B.D., Bouchez, L.C., et al. (2009). Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 8912–8917.

Macfarlan, T.S., Gifford, W.D., Driscoll, S., Lettieri, K., Rowe, H.M., Bonanomi, D., Firth, A., Singer, O., Trono, D., and Pfaff, S.L. (2013). ES cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *487*, 57–63.

Mak, W., Baxter, J., Silva, J., Newall, A.E., Otte, A.P., and Brockdorff, N. (2002). Mitotically stable association of polycomb group proteins eed and enx1 with the inactive x chromosome in trophoblast stem cells. Current Biology : CB *12*, 1016–1020.

Mak, W., Nesterova, T.B., De Napoles, M., Appanah, R., Yamanaka, S., Otte, A.P., and Brockdorff, N. (2004). Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. Science (New York, N.Y.) *303*, 666–669.

Maraghechi, P., Hiripi, L., Tóth, G., Bontovics, B., Bősze, Z., and Gócza, E. (2013). Discovery of pluripotency-associated microRNAs in rabbit preimplantation embryos and embryonic stem-like cells. Reproduction (Cambridge, England) *145*, 421–437.

Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., et al. (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. Cell *134*, 521–533.

Martello, G., Sugimoto, T., Diamanti, E., Joshi, A., Hannah, R., Ohtsuka, S., Göttgens, B., Niwa, H., and Smith, A. (2012). Esrrb Is a Pivotal Target of the Gsk3/Tcf3 Axis Regulating Embryonic Stem Cell Self-Renewal. Cell Stem Cell *11*, 491–504.

Martello, G., Bertone, P., and Smith, A. (2013). Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. The EMBO Journal.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells. Proceedings of the National Academy of Sciences *78*, 7634–7638.

Matin, M.M., Walsh, J.R., Gokhale, P.J., Draper, J.S., Bahrami, A.R., Morton, I., Moore, H.D., and Andrews, P.W. (2004). Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. Stem Cells *22*, 659–668.

Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., and Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. The EMBO Journal *18*, 4261–4269.

Melton, C., Judson, R., and Blelloch, R. (2010). Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *463*, 621–626.

Mitalipov, S.M., Kuo, H.C., Hennebold, J.D., and Wolf, D.P. (2003). Oct-4 expression in pluripotent cells of the rhesus monkey. Biol Reprod *69*, 1785–1792.

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell *113*, 631–642.

Moreadith, R.W., and Graves, K.H. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from the rabbit. Transactions of the Association of American Physicians *105*, 197–203.

Moreira de Mello, J.C., Araújo, É.S.S. de, Stabellini, R., Fraga, A.M., Souza, J.E.S. de, Sumita, D.R., Camargo, A.A., and Pereira, L. V. (2010). Random X Inactivation and Extensive Mosaicism in Human Placenta Revealed by Analysis of Allele-Specific Gene Expression along the X Chromosome. PLoS ONE *5*, e10947.

Munsie, M.J., Michalska, A.E., O'Brien, C.M., Trounson, A.O., Pera, M.F., and Mountford, P.S. (2000). Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. Curr Biol *10*, 989–992.

Murchison, E.P., Partridge, J.F., Tam, O.H., Cheloufi, S., and Hannon, G.J. (2005). Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 12135–12140.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. Nature Biotechnology *26*, 101–106.

De Napoles, M., Mermoud, J.E., Wakao, R., Tang, Y.A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T.B., Silva, J., Otte, A.P., Vidal, M., et al. (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. Developmental Cell *7*, 663–676.

Navarro, P., Chambers, I., Karwacki-Neisius, V., Chureau, C., Morey, C., Rougeulle, C., and Avner, P. (2008). Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. Science (New York, N.Y.) *321*, 1693–1695.

Niakan, K.K., and McCabe, E.R.B. (2005). DAX1 origin, function, and novel role. Molecular Genetics and Metabolism *86*, 70–83.

Nichols, J., and Smith, A. (2009). Naive and primed pluripotent states. Cell Stem Cell *4*, 487–492.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and 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., Silva, J., Roode, M., and Smith, A. (2009). Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. Development *136*, 3215–3222.

Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A., and Muramatsu, M. (1999). The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts

with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. Molecular and Cellular Biology *19*, 5453–5465.

Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? Development (Cambridge, England) *134*, 635–646.

Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. Genes Dev *12*, 2048–2060.

Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, a G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nature Genetics *24*, 372–376.

Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. Cell *123*, 917–929.

Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., and Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. Nature *460*, 118–122.

Okamoto, I., Arnaud, D., Le Baccon, P., Otte, A.P., Disteche, C.M., Avner, P., and Heard, E. (2005). Evidence for de novo imprinted X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. Nature *438*, 369–373.

Okamoto, I., Patrat, C., Thépot, D., Peynot, N., Fauque, P., Daniel, N., Diabangouaya, P., Wolf, J.-P., Renard, J.-P., Duranthon, V., et al. (2011). Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. Nature *472*, 370–374.

Osteil, P., Tapponnier, Y., Markossian, S., Godet, M., Schmaltz-Panneau, B., Jouneau, L., Cabau, C., Joly, T., Blachere, T., Gocza, E., et al. (2013). Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naive pluripotency. Biology Open.

Pain, B., Clark, M.E., Shen, M., Nakazawa, H., Sakurai, M., Samarut, J., and Etches, R.J. (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. Development (Cambridge, England) *122*, 2339–2348.

Patel, D., and Chaudhary, J. (2012). Increased expression of bHLH transcription factor E2A (TCF3) in prostate cancer promotes proliferation and confers resistance to doxorubicin induced apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications *422*, 146–151.

Pereira, L., Yi, F., and Merrill, B.J. (2006). Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. Molecular and Cellular Biology *26*, 7479–7491.

Pesce, M., Gross, M.K., and Scholer, H.R. (1998). In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. Bioessays *20*, 722–732.

Przybyla, L.M., Theunissen, T.W., Jaenisch, R., and Voldman, J. (2013). Matrix remodeling maintains embryonic stem cell self-renewal by activating Stat3. Stem Cells (Dayton, Ohio) *31*, 1097–1106.

Ptak, G.E., Tacconi, E., Czernik, M., Toschi, P., Modlinski, J.A., and Loi, P. (2012). Embryonic diapause is conserved across mammals. PloS One *7*, e33027.

Rathjen, P.D., Toth, S., Willis, A., Heath, J.K., and Smith, A.G. (1990). Differentiation inhibiting activity is produced in matrix-associated and diffusible forms that are generated by alternate promoter usage. Cell *62*, 1105–1114.

Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nat Biotechnol *18*, 399–404.

Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W., and Staudt, L.M. (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. Nature *345*, 686–692.

Rossant, J. (2001). Stem Cells from the Mammalian Blastocyst. Stem Cells *19*, 477–482.

Sado, T., Wang, Z., Sasaki, H., and Li, E. (2001). Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by Tsix. Development (Cambridge, England) *128*, 1275–1286.

Saito, S., Ugai, H., Sawai, K., Yamamoto, Y., Minamihashi, A., Kurosaka, K., Kobayashi, Y., Murata, T., Obata, Y., and Yokoyama, K. (2002). Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. FEBS Lett *531*, 389–396.

Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., et al. (2008). Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. Cell *132*, 487–498.

Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. Nature Medicine *10*, 55–63.

Scholer, H.R., Hatzopoulos, A.K., Balling, R., Suzuki, N., and Gruss, P. (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. Embo J *8*, 2543–2550.

Schoonjans, L., Albright, G.M., Li, J.L., Collen, D., and Moreadith, R.W. (1996). Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts. Molecular Reproduction and Development *45*, 439–443.

Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D.A., and Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 11307–11312.

Schultz, J., Lorenz, P., Gross, G., Ibrahim, S., and Kunz, M. (2008). MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. Cell Research *18*, 549–557.

Sinkkonen, L., Hugenschmidt, T., Berninger, P., Gaidatzis, D., Mohn, F., Artus-Revel, C.G., Zavolan, M., Svoboda, P., and Filipowicz, W. (2008). MicroRNAs control de novo DNA

methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. Nature Structural & Molecular Biology *15*, 259–267.

Slattery, C., Ryan, M.P., and McMorrow, T. (2008). E2A proteins: regulators of cell phenotype in normal physiology and disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology *40*, 1431–1436.

Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature *336*, 688–690.

Solter, D., and Knowles, B.B. (1975). Immunosurgery of mouse blastocyst. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *72*, 5099–5102.

Sritanaudomchai, H., Pavasuthipaisit, K., Kitiyanant, Y., Kupradinun, P., Mitalipov, S., and Kusamran, T. (2007). Characterization and multilineage differentiation of embryonic stem cells derived from a buffalo parthenogenetic embryo. Mol Reprod Dev *74*, 1295–1302.

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. Science (New York, N.Y.) *322*, 945–949.

Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., and Yancopoulos, G.D. (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. Science (New York, N.Y.) *267*, 1349–1353.

Starr, R., and Hilton, D.J. (1999). Negative regulation of the JAK/STAT pathway. BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology *21*, 47–52.

Stead, E., White, J., Faast, R., Conn, S., Goldstone, S., Rathjen, J., Dhingra, U., Rathjen, P., Walker, D., and Dalton, S. (2002). Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. Oncogene *21*, 8320–8333.

Steptoe, P.C., Edwards, R.G., and Purdy, J.M. (1971). Human blastocysts grown in culture. Nature *229*, 132–133.

Stevens, L.C. (1962). The biology of teratomas including evidence indicating their origin form primordial germ cells. Annee Biol *1*, 585–610.

Stevens, L.C., and Little, C.C. (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. Proc Natl Acad Sci U S A *40*, 1080–1087.

Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen, F., and Abbondanzo, S.J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. Nature *359*, 76–79.

Suda, Y., Suzuki, M., Ikawa, Y., and Aizawa, S. (1987). Mouse embryonic stem cells exhibit indefinite proliferative potential. J Cell Physiol *133*, 197–201.

Suemori, H., Tada, T., Torii, R., Hosoi, Y., Kobayashi, K., Imahie, H., Kondo, Y., Iritani, A., and Nakatsuji, N. (2001). Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. Dev Dyn *222*, 273–279.

Sumi, T., Oki, S., Kitajima, K., and Meno, C. (2013). Epiblast ground state is controlled by canonical Wnt/β-catenin signaling in the postimplantation mouse embryo and epiblast stem cells. PloS One *8*, e63378.

Tabibzadeh, S., and Hemmati-Brivanlou, A. (2006). Lefty at the crossroads of "stemness" and differentiative events. Stem Cells (Dayton, Ohio) *24*, 1998–2006.

Tachibana, M., Ma, H., Sparman, M.L., Lee, H.-S., Ramsey, C.M., Woodward, J.S., Sritanaudomchai, H., Masterson, K.R., Wolff, E.E., Jia, Y., et al. (2012). X-chromosome inactivation in monkey embryos and pluripotent stem cells. Developmental Biology 1–10.

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanaudomchai, H., et al. (2013). Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. Cell 1–11.

Taga, T., and Kishimoto, T. (1997). Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. Annual Review of Immunology *15*, 797–819.

Tai, C.-I., and Ying, Q.-L. (2013). Gbx2, a LIF/Stat3 target, promotes reprogramming to and retention of the pluripotent ground state. Journal of Cell Science *126*, 1093–1098.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell *126*, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell *131*, 861–872.

Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. Mol Cell Biol *18*, 4109–4117.

Takaoka, K., and Hamada, H. (2012). Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo. Development (Cambridge, England) *139*, 3–14.

Takemaru, K.I., and Moon, R.T. (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. The Journal of Cell Biology *149*, 249–254.

Tancos, Z., Nemes, C., Polgar, Z., Gocza, E., Daniel, N., Stout, T. a E., Maraghechi, P., Pirity, M.K., Osteil, P., Tapponnier, Y., et al. (2012). Generation of rabbit pluripotent stem cell lines. Theriogenology.

Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. Nature *448*, 196–199.

Thisse, B., and Thisse, C. (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. Developmental Biology *287*, 390–402.

Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell *51*, 503–512.

Thomson, J. a. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. Science *282*, 1145–1147.

Thomson, J.A., and Marshall, V.S. (1998). Primate embryonic stem cells. Curr Top Dev Biol *38*, 133–165.

Thomson, J. a, Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R. a, and Hearn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 7844–7848.

Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., and Hearn, J.P. (1996). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (Callithrix jacchus) blastocysts. Biol Reprod *55*, 254–259.

Tokuzawa, Y., Kaiho, E., Maruyama, M., Takahashi, K., Mitsui, K., Maeda, M., Niwa, H., and Yamanaka, S. (2003). Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. Molecular and Cellular Biology *23*, 2699–2708.

Tomioka, M., Nishimoto, M., Miyagi, S., Katayanagi, T., Fukui, N., Niwa, H., Muramatsu, M., and Okuda, A. (2002). Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. Nucleic Acids Research *30*, 3202–3213.

Ura, H., Usuda, M., Kinoshita, K., Sun, C., Mori, K., Akagi, T., Matsuda, T., Koide, H., and Yokota, T. (2008). STAT3 and Oct-3/4 control histone modification through induction of Eed in embryonic stem cells. The Journal of Biological Chemistry *283*, 9713–9723.

Vallier, L., Alexander, M., and 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.

Villa-Diaz, L.G., Ross, a M., Lahann, J., and Krebsbach, P.H. (2012). The Evolution of Human Pluripotent Stem Cell Culture: From Feeder Cells to Synthetic Coatings. Stem Cells (Dayton, Ohio).

Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature *394*, 369–374.

Wang, S., Tang, X., Niu, Y., Chen, H., Li, B., Li, T., Zhang, X., Hu, Z., Zhou, Q., and Ji, W. (2007a). Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. Stem Cells (Dayton, Ohio) *25*, 481–489.

Wang, S., Shen, Y., Yuan, X., Chen, K., Guo, X., Chen, Y., Niu, Y., Li, J., Xu, R.H., Yan, X., et al. (2008a). Dissecting signaling pathways that govern self-renewal of rabbit embryonic stem cells. J Biol Chem *283*, 35929–35940.

Wang, X., Miller, D.C., Clark, A.G., and Antczak, D.F. (2012). Random X inactivation in the mule and horse placenta. Genome Research *22*, 1855–1863.

Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., and Blelloch, R. (2007b). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. Nature Genetics *39*, 380–385.

Wang, Y., Baskerville, S., Shenoy, A., Babiarz, J.E., Baehner, L., and Blelloch, R. (2008b). Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. Nature Genetics *40*, 1478–1483.

Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J.E. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. Cell *82*, 241–250.

Wianny, F., Bernat, A., Huissoud, C., Marcy, G., Markossian, S., Cortay, V., Giroud, P., Leviel, V., Kennedy, H., Savatier, P., et al. (2008). Derivation and cloning of a novel rhesus embryonic stem cell line stably expressing tau-green fluorescent protein. Stem Cells (Dayton, Ohio) *26*, 1444–1453.

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., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature *336*, 684–687.

Wilmut, I., Schnieke, a E., McWhir, J., Kind, a J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature *385*, 810–813.

Wobus, A.M., Wallukat, G., and Hescheler, J. (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca2+ channel blockers. Differentiation; Research in Biological Diversity *48*, 173–182.

Wray, J., Kalkan, T., Gomez-Lopez, S., Eckardt, D., Cook, A., Kemler, R., and Smith, A. (2011). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. Nature Cell Biology *13*, 838–845.

Xiao, Z., Chen, Z., Gunasekera, A.H., Sowin, T.J., Rosenberg, S.H., Fesik, S., and Zhang, H. (2003). Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. The Journal of Biological Chemistry *278*, 21767–21773.

Xu, R.H., Chen, X., Li, D.S., Li, R., Addicks, G.C., Glennon, C., Zwaka, T.P., and Thomson, J.A. (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. Nat Biotechnol *20*, 1261–1264.

Xu, R.H., Peck, R.M., Li, D.S., Feng, X., Ludwig, T., and Thomson, J.A. (2005). Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. Nat Methods *2*, 185–190.

Xue, F., Ma, Y., Chen, Y.E., Zhang, J., Lin, T.-A., Chen, C.-H., Lin, W.-W., Roach, M., Ju, J.-C., Yang, L., et al. (2012). Recombinant rabbit leukemia inhibitory factor and rabbit embryonic fibroblasts support the derivation and maintenance of rabbit embryonic stem cells. Cellular Reprogramming *14*, 364–376.

Yan, S.Y. (2000). [A historical review and some comments on the nuclear transplantation in fish]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology *16*, 541–547.

Yang, J.R., Shiue, Y.L., Liao, C.H., Lin, S.Z., and Chen, L.R. (2009). Establishment and characterization of novel porcine embryonic stem cell lines expressing hrGFP. Cloning Stem Cells *11*, 235–244.

Ye, S., Li, P., Tong, C., and Ying, Q.-L. (2013). Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor Tfcp2l1. The EMBO Journal.

Yeom, Y.I., Fuhrmann, G., Ovitt, C.E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hübner, K., and Schöler, H.R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. Development (Cambridge, England) *122*, 881–894.

Yi, F., Pereira, L., and Merrill, B.J. (2008). Tcf3 functions as a steady-state limiter of transcriptional programs of mouse embryonic stem cell self-renewal. Stem Cells (Dayton, Ohio) *26*, 1951–1960.

Yi, F., Pereira, L., Hoffman, J.A., Shy, B.R., Yuen, C.M., Liu, D.R., and Merrill, B.J. (2011). Opposing effects of Tcf3 and Tcf1 control Wnt stimulation of embryonic stem cell self-renewal. Nature Cell Biology *13*, 762–770.

Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. Cell *115*, 281–292.

Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. Nature *453*, 519–523.

Yoshida, K., Chambers, I., Nichols, J., Smith, A., Saito, M., Yasukawa, K., Shoyab, M., Taga, T., and Kishimoto, T. (1994). Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. Mech Dev *45*, 163–171.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science *318*, 1917–1920.

Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., and Dailey, L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. Genes & Development *9*, 2635–2645.

Zakhartchenko, V., Flisikowska, T., Li, S., Richter, T., Wieland, H., Durkovic, M., Rottmann, O., Kessler, B., Gungor, T., Brem, G., et al. (2011). Cell-mediated transgenesis in rabbits: chimeric and nuclear transfer animals. Biology of Reproduction *84*, 229–237.

Zernicka-Goetz, M. (2005). Cleavage pattern and emerging asymmetry of the mouse embryo. Nature Reviews. Molecular Cell Biology *6*, 919–928.

Zhang, X., Zhang, J., Wang, T., Esteban, M.A., and Pei, D. (2008). Esrrb activates Oct4 transcription and sustains self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. The Journal of Biological Chemistry *283*, 35825–35833.

Zhao, J., Sun, B.K., Erwin, J.A., Song, J.-J., and Lee, J.T. (2008). Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. Science (New York, N.Y.) *322*, 750–756.

Zhong, X., Li, N., Liang, S., Huang, Q., Coukos, G., and Zhang, L. (2010). Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells. The Journal of Biological Chemistry *285*, 41961–41971.

Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J.E. (1994). Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. Science (New York, N.Y.) *264*, 95–98.

Zovoilis, A., Smorag, L., Pantazi, A., and Engel, W. (2009). Members of the miR-290 cluster modulate in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. Differentiation; Research in Biological Diversity *78*, 69–78.

ANNNEXES

« La science a la chance et la modestie de savoir qu'elle est dans le provisoire, de déplacer les frontières de l'inconnu et d'avancer. »
Marc Augé (1935 -)

5 ANNEXES

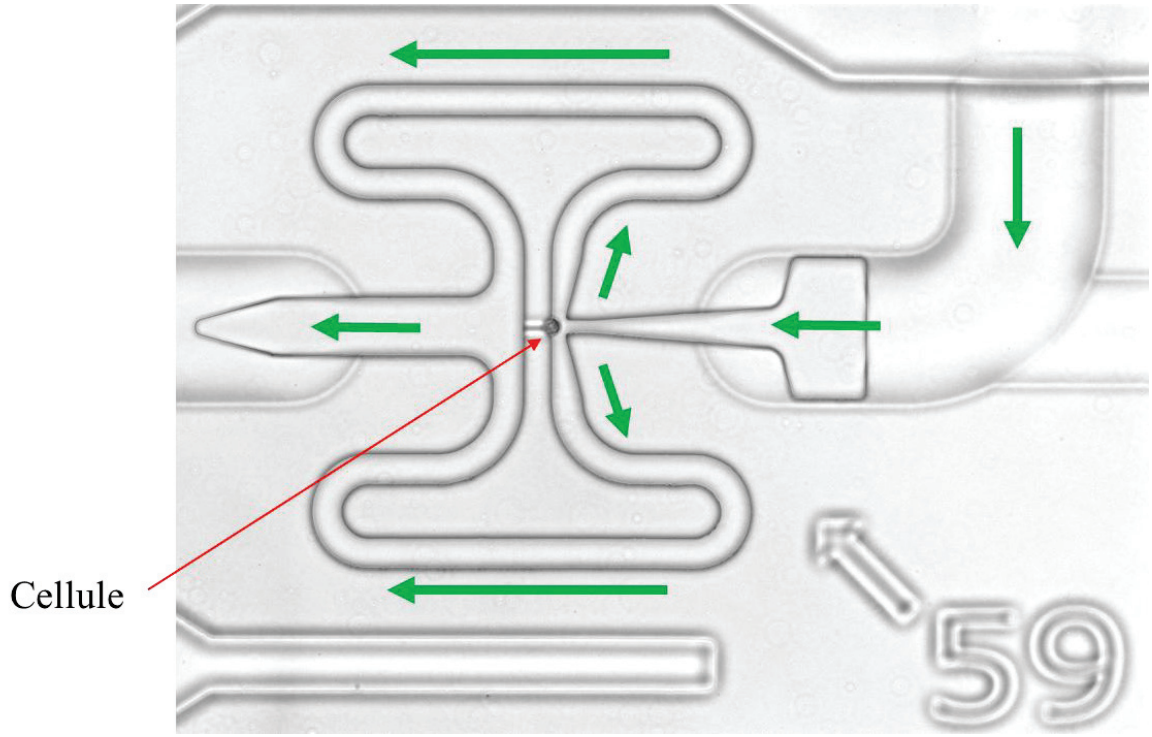


Figure 43: Photographie d'un puits (n°59) d'une plaque Fluidigm

Image prise au grossissement x40

Les flèches vertes indiquent le trajet effectué par les cellules. Aléatoirement une d'entre elles va se bloquer (flèche rouge). Les autres continuent leur parcours dans les 96 autres puits.

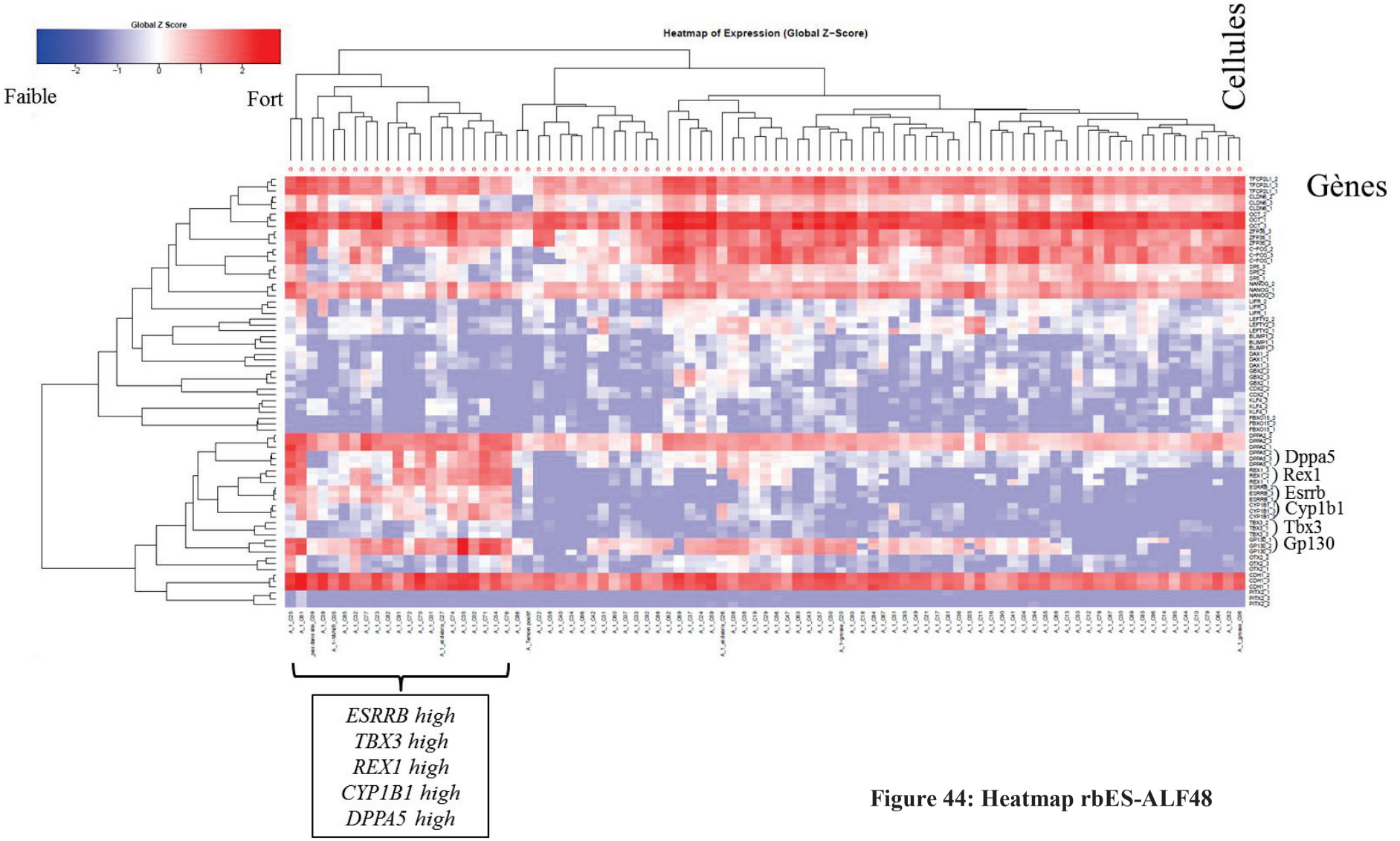


Figure 44: Heatmap rbES-ALF48

SC1 = 21 / 89 cells = 23,6%

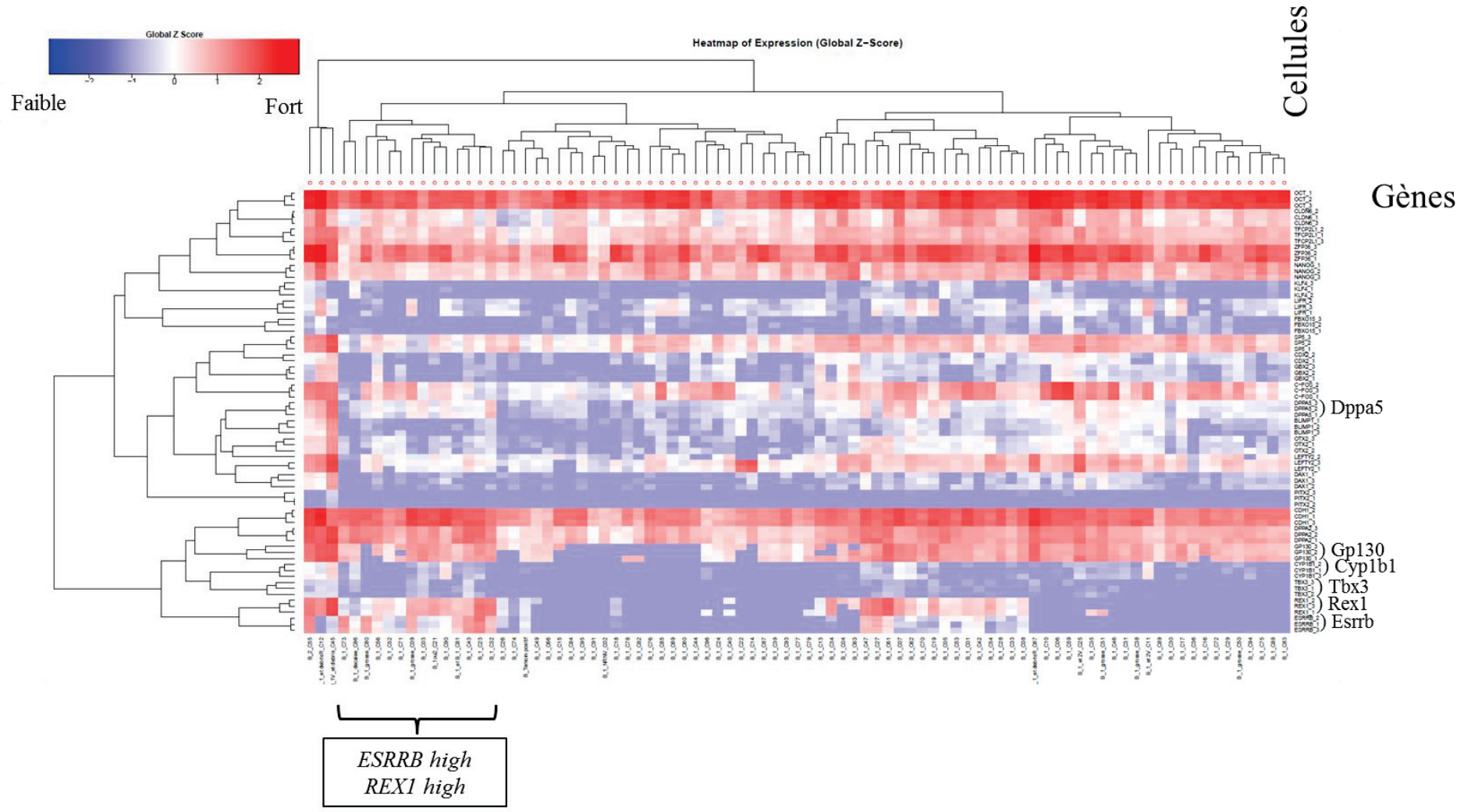


Figure 45: Heatmap rbES-AF62

SC1 = 14 / 87 cells = 16,0%

Article n°2: Generation of rabbit pluripotent stem cell lines.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

Theriogenology

Theriogenology xx (2012) xxx

www.theriojournal.com

Review

Generation of rabbit pluripotent stem cell lines

Z. Tancos[a], C. Nemes[b], Z. Polgar[b], E. Gocza[c], N. Daniel[d], T.A.E. Stout[e,f], P. Maraghechi[c], M.K. Pirity[b,1], P. Osteil[g,h,i], Y. Tapponnier[g,i], S. Markossian[g,h,i], M. Godet[g,h,i], M. Afanassieff[g], Z. Bosze[c], V. Duranthon[d], P. Savatier[g], A. Dinnyes[a,b,e,*]

[a] *Molecular Animal Biotechnology Laboratory, Szent Istvan University, Godollo, Hungary*
[b] *BioTalentum, Ltd, Godollo, Hungary*
[c] *Agricultural Biotechnology Center, Godollo, Hungary*
[d] *INRA, UMR 1198 Biologie du Developpement et Reproduction, Jouy en Josas, France*
[e] *Department of Farm Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands*
[f] *Department of Equine Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands*
[g] *INSERM U846, Stem Cell and Brain Research Institute, Bron, France*
[h] *USC 2008 INRA/INSERM/UCB Lyon, Bron, France*
[i] *Universite de Lyon, Lyon, France*

Received 1 April 2012; received in revised form 9 June 2012; accepted 10 June 2012

Abstract

Pluripotent stem cells have the capacity to divide indefinitely and to differentiate into all somatic cells and tissue lines. They can be genetically manipulated in vitro by knocking genes in or out, and therefore serve as an excellent tool for gene function studies and for the generation of models for some human diseases. Since 1981, when the first mouse embryonic stem cell (ESC) line was generated, many attempts have been made to generate pluripotent stem cell lines from other species. Comparative characterization of ESCs from different species would help us to understand differences and similarities in the signaling pathways involved in the maintenance of pluripotency and the initiation of differentiation, and would reveal whether the fundamental mechanism controlling self-renewal of pluripotent cells is conserved across different species. This report gives an overview of research into embryonic and induced pluripotent stem cells in the rabbit, an important nonrodent species with considerable merits as an animal model for specific diseases. A number of putative rabbit ESC and induced pluripotent stem cell lines have been described. All of them expressed stem cell-associated markers and maintained apparent pluripotency during multiple passages in vitro, but none have been convincingly proven to be fully pluripotent in vivo. Moreover, as in other domestic species, the markers currently used to characterize the putative rabbit ESCs are suboptimal because recent studies have revealed that they are not always specific to the pluripotent inner cell mass. Future validation of rabbit pluripotent stem cells would benefit greatly from a validated panel of molecular markers specific to pluripotent cells of the developing rabbit embryos. Using rabbit-specific pluripotency genes may improve the efficiency of somatic cell reprogramming for generating induced pluripotent stem cells and thereby overcome some of the challenges limiting the potential of this technology.
© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

[1] Current address: Institute of Genetics, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary.

* Corresponding author. Tel.: +36 20 510 9632; fax: +36 28 526 243.
E-mail address: andras.dinnyes@biotalentum.hu (A. Dinnyes).

0093-691X/$ – see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.017

Keywords: Rabbit; Pluripotency; Embryonic stem cell; Induced pluripotent stem cell

Contents

1. Introduction 2
2. Biology of pluripotency in rabbit 2
2.1. Stem cell regulatory pathways in rabbits 2
2.2. Rabbit-specific pluripotency gene sequences 3
2.3. MicroRNA regulation of stemness in the rabbit 4
2.4. Antibodies (ABs) which work in the rabbit 5
3. Technologies to reprogram rabbit somatic cells to pluripotency 5
3.1. Nuclear transfer results and limitations in the rabbit 5
3.2. Generation of rESC lines 6
3.3. Generation of riPSC lines 7
3.4. Chimera production with ESCs/iPSCs 9
4. Conclusion and the future 10
4.1. Progress toward understanding pluripotency using systems biology; biomedical applications will emerge 10
Acknowledgments 10
References 11

1. Introduction

The rabbit is one of the most frequently used and relevant nonrodent species for modeling disease processes. The main biomedical applications of genetically modified organism rabbits are as models for human disease and in biopharming (live bioreactors) for the large scale production of pharmaceutically important proteins required for the treatment of human diseases.

Recombinant protein expression in the milk of genetically modified organism animals has been extensively studied in the past 25 yr, and has undergone significant recent improvements both from a methodological point of view and in terms of reaching the market. In 2010, Pharming Group NV (Leiden, The Netherlands) received European approval for a product (Ruconest) for treating acute attacks of hereditary angioedema; the drug which is now on the market is harvested from the milk of transgenic rabbits.

The rabbit has an advantage over rodents in human disease modeling in that it is phylogenetically closer to primates than the rodents [1] and large enough to permit nonlethal monitoring of physiological changes. For these reasons, a number of research groups have chosen transgenic rabbits as models to study lipoprotein metabolism and atherosclerosis. In this respect, the economically most important chronic diseases of the metabolic syndrome complex: diabetes mellitus, hypertension, atherosclerosis, hyperlipidemia, and obesity cannot be adequately mimicked in mice. The rabbit is also a more appropriate model than rodents for prenatal development and the long-lasting effects of perturbations in the prenatal period on adult health and complex diseases. Similarities in biochemical and physiological processes, including placental structure, between human and rabbit make the latter an excellent model for reproductive studies [2,3]. In addition, because rabbits have relatively large eyes, studies on the pathophysiology of retinal degeneration using the rabbit as a model have recently been published [4]. Beyond that, transgenic rabbit models of human disorders connected to cardiac electrophysiology and hypertrophy have turned out to be extremely useful in pharmacogenomic studies and design of disease prevention programs [5].

2. Biology of pluripotency in rabbit

2.1. Stem cell regulatory pathways in rabbits

Pluripotency and the capacity for self-renewal allow embryonic stem cells (ESCs) to either divide continuously in the undifferentiated state or to differentiate into any somatic cell type. These characteristics are controlled by a number of cell signaling pathways and therefore depend on the provision of specific conditions or factors. Rabbit embryonic stem cells (rESC) resemble primate ESCs more closely than mouse ESCs [6]. The most important signaling pathways involved in the maintenance of pluripotency and the capacity for self-

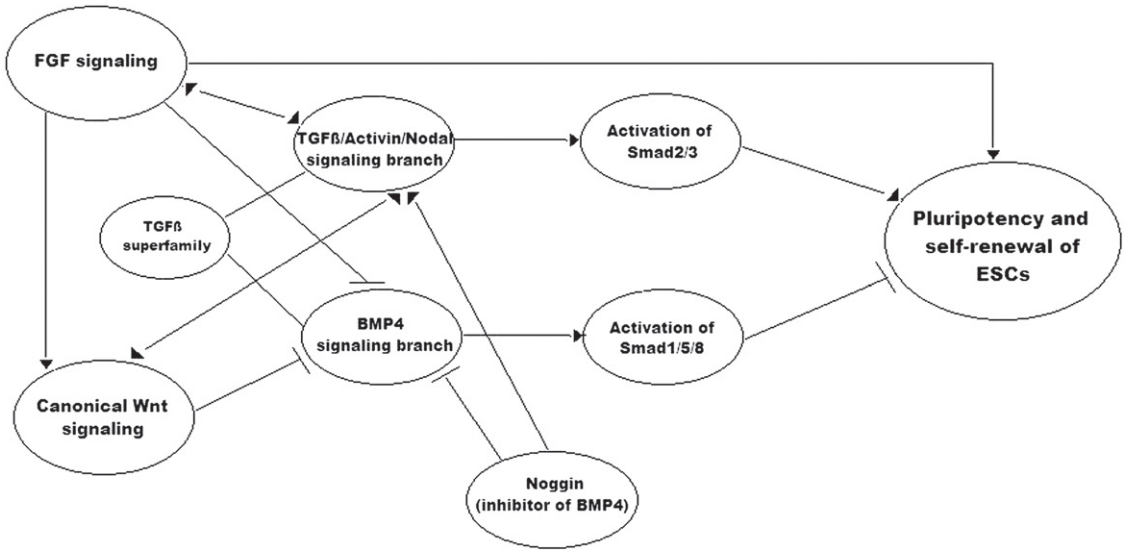


Fig. 1. A scheme illustrating the interactions among fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF), bone morphogenetic protein (BMP), and Wnt signaling to sustain rabbit embryonic stem cells (rESC) self-renewal (based on Wang et al. 2008 [6]).

renewal in primate ESCs are fibroblast growth factor (FGF), which activates the mitogen-activated protein kinase and Akt pathways and transforming growth factor (TGF)-β which acts through Smad2/3/4. The Wnt pathway also supports pluripotency by activating β-catenin. Signaling through these pathways results in the activation and expression of three essential pluripotency-associated transcription factors: Oct4, Sox2, and Nanog. These factors are all very important in maintaining the pluripotent state of ESCs. The interaction between Sox2 and Oct4 activates expression of pluripotent-specific target genes and also regulates their own expression. Nanog is also incorporated into the Sox2-Oct4 complex, which is a transcription factor with an essential role in maintaining the pluripotent state of the inner cell mass (ICM) and of ESCs derived from the ICM [7]. Nanog suppresses differentiation of ESCs toward the extraembryonic endoderm and trophectoderm lineages. In interaction with Smad1, Nanog inhibits bone morphogenetic protein (BMP)-induced mesoderm differentiation of ESCs.

However, the signaling pathways that regulate ESC pluripotency in the rabbit have not been definitively identified. Wang et al. showed that inhibition of the TGF, FGF, and canonical Wnt/catenin (Wnt) pathways resulted in the differentiation of rESC followed by downregulation of Smad2/3 phosphorylation and β-catenin expression and upregulation of the phosphorylation of Smad1 and catenin. Together the FGF and TGF pathways play important roles in the maintenance of pluripotency by rESCs and in the activation of Smad2/3 and inhibition of Smad1/5/8 signaling. FGF activity depends on the TGF pathway, although FGF alone also has effects directly or indirectly on the self-renewal of rESCs. Wnt signaling has a less critical role than the FGF and TGF pathways, but also affects rESC state. Wang et al. showed that the TGF, FGF, and Wnt pathways are required for rESC pluripotency and that inhibition of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AK mouse strain thymoma (AKT) signaling facilitates rESC differentiation [6] (Fig.1).

2.2. *Rabbit-specific pluripotency gene sequences*

ESCs and induced pluripotent stem cells (iPSCs) are pluripotent cells with the ability to differentiate into components of all three embryonic germ layers (ectoderm, endoderm, and mesoderm). There are a small number of transcriptional regulators, including Oct4, Sox2, and Nanog, that are central components of this pluripotency network. This network contributes to self-renewal and prevents differentiation. While promoting the equipoised state of pluripotency, these factors also control differentiation toward specific cell lineages [8–11]. Genes involved in maintaining the pluripotent cell state have been well characterized functionally in the mouse. However, little is known about the regulation of self-renewal and pluripotency in rESCs and rabbit iPSCs (riPSCs).

The importance of the pluripotency genes was clearly demonstrated when, in 2006, Takahashi and Yamanaka [12] identified four factors which, when cotransfected and expressed in mouse adult fibroblast cells, caused those cells to revert to the pluripotent state. These four factors were:

1. POU (**P**ituitary-specific Pit-1, **O**ctamer transcription factor proteins Oct-1 and Oct-2, neural **U**nc-86 transcription factor from Caenorhabditis elegans) class 5 homeobox (1Oct4/Pou5f1) encoded by the gene pou5f1 (POU domain, class 5, transcription factor 1); a transcription factor expressed in undifferentiated ESCs. Oct4 expression is critical to the maintenance of the pluripotent state.
2. SRY (sex-determining region Y)-box containing gene 2 (Sox2) is another transcription factor critical for the maintenance of pluripotency. It acts in parallel with Oct4 in regulating the expression of target genes involved in the maintenance of pluripotency.
3. v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-Myc) is a well known proto-oncogene. This gene encodes a transcription factor that controls the expression of genes involved in the regulation of cell proliferation, growth, differentiation, apoptosis, and malignant transformation.
4. Krüppel-like factor 4 (Klf-4) is a transcription factor expressed in undifferentiated ESCs. It is also expressed in specific cells in the adult organism, including cells in the gut, testis, and lungs. It regulates proliferation, differentiation, and cell survival.

Although Nanog does not belong to the original four "Yamanaka factors", is also an important pluripotency factor that acts together with Oct4 and Sox2 in establishing ESC identity. Besides this, Nanog is downstream of Klf4 and is switched on by the four factors during iPSC reprogramming.

One approach to identifying putative rabbit pluripotency genes is based on phylogenetic sequence comparison among species. Using basic local alignment search tool (BLAST) searches against public databases, the homologues of several mammalian pluripotency genes (*Nanog, Oct4, Klf4, c-Myc, Sox2*) have been identified. Another approach to identifying candidate pluripotency factors is to perform a search in the Rabbit Genome Resource Database, because the sequencing of the rabbit genome is nearly complete. These databases have yielded partial and/or full rabbit *Nanog, Oct4, c-Myc*, and *Sox2* sequences. The gene sequences found in the Rabbit Genome Resource Database show different degrees of homology to the mouse and human orthologs. Those for Oct4 and c-Myc are relatively close, while Nanog differs more at both the nucleic and amino acid levels [13]. The identified differences might explain the difficulties encountered using human or murine cytokines to establish rESC and riPSC that are capable of germ line transmission via chimera production.

2.3. MicroRNA regulation of stemness in the rabbit

Recent studies have indicated that microRNAs (miRNAs), a class of noncoding endogenous small RNA molecules, participate in posttranscriptional regulation of gene expression and play a key role in stem cell self-renewal and differentiation [14]. ESC-specific miRNAs are abundant in pluripotent stem cells, but disappear rapidly during differentiation [14,15]. The miR290-295 cluster is expressed during early embryogenesis and is functionally important in mouse ESCs and embryonic carcinoma cells [14]. Overexpression of miR290-295 prevents ESCs from embarking on differentiation, probably by preventing ESCs accumulating in the G1 phase [16]. The miR302-367 cluster is also highly expressed in both human and murine ESCs, and downregulated upon differentiation [17]. In addition, DGCR8 and Dicer knockout studies indicate that miRNA pathways have a key regulatory function in ESC self-renewal and pluripotency [18]. Moreover, the ESC-specific miRNA promoters are regulated by Oct4, Sox2, and Nanog [19–22]. The ESC-specific miRNAs can directly target these transcription factors, establishing a complex feedback loop, which is a key regulator of pluripotency [22]. A recent study on iPSC derivation shows that expression of the miR302-367 cluster rapidly and efficiently reprograms mouse and human somatic cells to an iPSC state without the requirement for exogenous transcription factors, and that it is even more efficient than the standard Oct4/Sox2/Klf4/Myc-mediated method [23]. Other reports show that c-Myc replacement by miR-294 can enhance the reprogramming of somatic cells to iPSCs [24]. Based on these studies, we aimed to characterize rabbit stem-like cell specific miRNAs. We observed high expression of miR302a, miR302b, and miR367, whereas miR-290, miR-292, and miR-294 were expressed at lower levels in rESCs. We could not detect the expression of the miR371-373 cluster in rabbit ESCs. The SOLiD Sequencing System allowed us to identify numerous miRNAs that appear to be specific to rESCs. The newly described miRNAs

have already been validated on rabbit embryos and ESCs (Maraghechi et al., manuscript in preparation). Further profiling of the rabbit ESC-specific miRNA signature is expected to help solve the problems encountered during rabbit ESC and iPSC derivation.

2.4. Antibodies (ABs) which work in the rabbit

Rabbit ESCs and iPSCs morphologically resemble human ESCs; however, their proliferation characteristics more closely resemble those observed for mouse ESCs. Differences were also identified when the cell lines were studied for pluripotency markers by immunocytochemistry. The possible explanations for the differences observed include both technical and biological elements, such as the absence of specific ABs raised against rabbit putative pluripotency protein sequences; and the varying degree of homology between the human and rabbit amino acid sequences used to raise the ABs. The ABs used for characterizing rESCs and riPSCs have all been raised against human protein sequences. This is because the homology between human and rabbit pluripotency marker sequences appears to be high despite the absence of complete, exact rabbit pluripotency gene sequence information. Because it is difficult to generate appropriate rabbit proteins, the use of the commercially available ABs raised against human pluripotency markers is the "next best" option, but there are inevitable failures of cross-reactivity. The most frequently used ABs to detect Oct4 are those produced commercially by Santa Cruz Biotechnology [25–27] and Chemicon [10]. The AB from Santa Cruz Biotechnology is a goat polyclonal AB raised against a peptide mapping near the N-terminus of human Oct4 and that is specific for the nuclear localized Oct4A isoform. This AB exhibits strong positive staining for Oct4 with a nuclear localization. By contrast, the Chemicon AB is an anti-Oct4 mouse monoclonal AB raised against a recombinant protein corresponding to amino acids 143 to 359 of human Oct4 and that detects both nuclear (Oct4A) and cytoplasmic (Oct4B) isoforms, as demonstrated by Wang, et al. [10]. In the case of the stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA1), which is one of the most important ESC markers, more contradictory results have been published. The most frequently used ABs for this surface marker are those from Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) described by Honda et al. [26,28], who generated the first riPSC lines, and that from Chemicon which was used by Wang et al. [10] and by Intawicha et al. [27]. Honda et al. [26,28] and Wang et al. [10] showed potentially positive immunostaining for SSEA1. By contrast, Intawicha et al. [27] did not observe positive staining for SSEA1 using the same AB as Wang et al. [10]. One possible explanation for the inconsistent results might be sample preparation: the presence or absence of detergents like Tween 20 in the blocking solution. Tween 20 is a nonionic detergent that is nonselective in nature and may extract proteins along with the lipids [29–30], making the membranes permeable to ABs. The ABs against the membrane markers SSEA4, Tra-1-60 and Tra-1-81, which are also often used to characterize ESCs and iPSCs, are available both from Chemicon and DSHB and both sets achieve the expected membrane staining. In the case of Nanog, there are two different sets of ABs used regularly: the first one is distributed by Cosmobio, Japan and was used by Honda et al. [26] and the other is provided by Abcam and was used by Intawicha et al. [27]. The latter AB did not work well according to the published data, and since that publication its production has been discontinued.

Thus, based on available publications the ABs that can be used to effectively characterize rESC and riPSCs are those against Oct4 (from Santa Cruz Biotechnology and Chemicon), Nanog (from Cosmobio and Abcam), SSEA1, SSEA4, Tra-1-60, and Tra-1-81 (from Chemicon and DSHB). Overall, this suggests that it would be helpful to produce rabbit-specific ABs raised against rabbit protein sequences, thereby emphasizing the need to clone rabbit specific cDNAs. This would make it feasible to test and produce ABs which work in the rabbit, and could open up further possibilities toward using the rabbit as a model system for human development and disease.

3. Technologies to reprogram rabbit somatic cells to pluripotency

3.1. Nuclear transfer results and limitations in the rabbit

Reprogramming of somatic cells to pluripotency can be achieved by nuclear transfer (NT) into enucleated oocytes. Compared with normal fertilized preimplantation embryos, somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived embryos have the added challenge of silencing their somatic-specific genes while reactivating all the embryo-related genes and pathways. In this respect, SCNT is a powerful tool for improving our understanding of the signaling pathways involved in pluripotency and differentiation.

In the late 1980s and during the 1990s, the rabbit was one of the mammalian species in which investiga-

tors pioneered nuclear transfer technologies, in particular when the first embryonic clones were produced by introducing rabbit embryonic cell nuclei (blastomeres from 8- to 16-cell stage embryos) into enucleated oocytes [31–34]. Since the first mammals were produced [35] by SCNT, many species have been cloned using this technology. Nevertheless, when differentiated somatic cells were used as donor cells for SCNT in the rabbit, it was found that this species was relatively difficult to clone when compared with other mammals. It was not until 2002 that the first rabbits cloned by SCNT, using freshly prepared adult rabbit cumulus cells as donor cells, were born [36,37]. Since then only a few other groups have published successful generation of cloned live rabbits using somatic donor cells or stem cells [38–41], these did however include transgenic rabbits expressing green fluorescent protein [41,42]. Although a good proportion (up to 55%) of reconstructed embryos develops to the blastocyst stage, the development to term after embryo transfer is low (average 2%). A better development to term rate was obtained when multipotent stem cells were used as donor cells (4%) [41]. Nevertheless, relatively few resulted in live offspring and fewer still survived to sexual maturity; according to published data collected by Zakhartchenko et al. [41], from 42 cloned rabbits born alive, only 17 reached sexual maturity [36–40]. The greatest number of cloned rabbits surviving to adulthood (eight) was reported by Meng et al. [40] using cumulus cells as nuclear donors.

Successful nuclear reprogramming from somatic to pluripotent status is the key event in NT, and depends on the epigenetic status of the nucleus. There is therefore a reason why cells with high genome plasticity potential (mesenchymal stem cells) might be better nuclear donors than more differentiated cell types. In the case of rabbit NT, putative ESCs [25] or iPSCs [26], may be even more successful donor cells for NT. Studies [40,43] have also investigated the use of Trichostatin A (TSA; a histone deacetylase inhibitor) to examine the effect of methylation changes on nuclear reprogramming. In the rabbit, the mechanism and the long-term effects of TSA treatment on postimplantation and postpartum development require further studies, not least because in the studies of Meng et al. [40] all the TSA-treated animals died within 19 days, while among the non–TSA-treated SCNT animals a reasonable proportion survived to adulthood and gave birth to healthy progeny. In the case of the rabbit, progress and difficulties encountered during the SCNT procedure might be informative for identifying the critical factors implicated in reprogramming defects.

3.2. Generation of rESC lines

Over the past 5 yr, four independent groups have reported the establishment of rESC (or ESC-like) lines (Table 1A) [10,25,41,44–49]. Rabbit ESCs exhibit the cardinal features of pluripotent stem cells: the capacity to self-renew indefinitely (or at least for a large number of passages) in vitro under appropriate culture conditions, and to differentiate into specialized cells of ectodermal, mesodermal, and endodermal origins. Like their murine and primate counterparts, rESCs also have the capacity to form teratomas when injected into an immunodeficient mouse. One key factor in the derivation of rESC lines appears to be the density of feeder cells [25]. Using the conditions described by Honda and colleagues [26], we could derive several rESC lines. All of them displayed unlimited growth (until passage 50) and ability to differentiate into the three germ layers (Osteil et al. manuscript in preparation). Rabbit ESCs grow in flat colonies, resembling the colonies of primate (human and nonhuman) ESCs. They can be passaged after collagenase treatment followed by gentle dissociation (Osteil et al., unpublished data). It has been shown that both FGF2, through ERK and PI3K activation, and Activin/Nodal signaling, through Smad2/3 activation, are necessary to maintain the pluripotent status of rESCs [6,28]. The question of whether rESCs also require leukemia inhibitory factor (LIF)-signaling for self-renewal is controversial. Studies performed by Honda and colleagues demonstrated that treatment with a janus kinase (JAK) kinase inhibitor, resulting in the loss of phosphorylated signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3), had no effect on self-renewal [28]. By contrast, the results of studies performed with ESC lines derived from parthenogenetically activated rabbit embryos suggested that both LIF and FGF2 were capable of sustaining self-renewal, and that the two factors could act cooperatively to support stemness in the absence of feeder cells [27,50]. The rESC lines isolated in our laboratory do not require LIF to ensure a blockade to differentiation. However, the requirement, either of autocrine LIF signaling, or of paracrine LIF signaling involving the feeder cells, acting in synergy with FGF2 signaling cannot be excluded (Osteil et al., unpublished).

In an effort to generate rESCs capable of self-renewal in the naive state of pluripotency, ICM cells were plated on feeder cells in N2/B27 medium supplemented with LIF, ERK (PD03225901), and GSK-3

(CHIR99021) inhibitors (2 inhibitors + LIF medium), according to the protocol described previously for mouse and rat ESC derivation [51,52]. As described for rodents [53], rabbit embryos were also treated with PD0325901 to promote the growth of pluripotent stem cells. Most ICMs from treated and nontreated embryos gave rise to primary outgrowths when plated. No difference was observed between outgrowths originating from PD0325901-treated and control embryos and none of them could be passaged more than once. These results indicate that pluripotent stem cells derived from rabbit ICM are not capable of self-renewal in the culture conditions described previously for rodents.

As indicated above, ingredients of the media for maintaining stable rESC lines differ between laboratories. The basic medium in most cases is Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) or supplemented versions thereof, such as DMEM/F12 or Knock-Out DMEM. The common ingredients are glutamine, β-mercaptoethanol and nonessential amino acids. With regard to the specific supplements, most research groups use either LIF or FGF2, which is why the question of whether rESCs require one or both of these factors is still controversial. The situation is similar with respect to serum content; the medium may contain fetal calf serum or Knock-Out Serum Replacement. To date there is no consensus about what method or solutions are the most effective for the establishment of rESCs.

3.3. Generation of riPSC lines

Generation of iPSCs from somatic cells demonstrates that adult mammalian cells can be reprogrammed to a pluripotent state by treating them with four major factors. iPSC technology is a unique tool for deriving specific stem cells to study disease and for developing possible treatments for degenerative disorders. iPSCs can be promising tools for drug screening, toxicology testing, and for generating knockout or transgenic animal models. The first iPSCs were generated by retroviral vector transduction using *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4*, and *Sox2* [12,54–56]. The disadvantage of the retroviral system is that it stably integrates into the host genome, causing malignant transformations in chimeric animals [55]. The application of a constitutively active lentivirus system could not overcome this drawback because it was even less efficiently silenced in pluripotent cells than retroviral vectors [57,58]. The next generation of the lentiviral system is represented by the inducible lentiviral vector, in which the expression is regulated by doxycycline. Drug resistance influences the expression of the transgene, reducing the risk of constitutive expression, and providing a selection tool for reprogrammed iPSCs [57,59]. Lentiviral vectors have become more efficient than retroviral vectors at infecting different somatic cell types and can be used to express polycistronic cassettes encoding all four reprogramming factors [60,61]. The best solution given the requirements of safety for eventual therapy is the generation of integration-free iPSCs. Techniques used to generate integration-free iPSCs can be divided into three categories: (1) methods using nointegrating vectors, (2) methods using integrating vectors that can be removed from the genome, and (3) methods that do not use nucleic acid-based vectors at all. Several laboratories have developed integration-dependent gene delivery vectors containing loxP sites permitting the excision of a transgene by Cre-recombinase [62,63]. For example, PiggyBac [64,65] and Sleeping Beauty transposons [66–68] can be introduced into the host genome and removed by the transposase or a cre-lox system. Successful reprogramming was also achieved by delivering the reprogramming factors as purified recombinant proteins [69], or using synthetic modified messenger RNA (mRNA) [70] and miRNA [23]. In human and murine cells, these technologies already work to some extent. Using a variety of methods, iPSCs have now been derived from several different species: mouse [12,64,65] human [23,63,70–73], rat [74], rhesus monkey [75], dog [76], horse [77], and pig [78]. Honda et al. [26] were the first group to report the establishment of riPSC lines which they produced from adult rabbit liver and stomach cells using lentiviral vectors carrying the human reprogramming genes: *c-Myc*, *Klf4*, *Sox2*, and *Oct4* (Table 1B). The newly generated riPSCs resembled human iPSCs; they formed flattened colonies with sharp edges and proliferated indefinitely in the presence of FGF2. They expressed the endogenous pluripotency markers *c-Myc*, *Klf4*, *Sox2*, *Oct4*, and *Nanog*, while the exogenous human genes were completely silenced. In vitro, riPSCs rapidly differentiated into ectoderm, mesoderm, and endoderm. In vivo they formed teratomas, but they were unable to form chimeras. Thus, the newly generated rabbit iPSCs fulfilled all requirements of pluripotency, except the chimera test. However, global gene expression analysis revealed slight, but definite differences between ESCs and iPSCs.

We generated riPSC lines by using retroviral vectors to introduce the human reprogramming genes (*c-Myc*, *Klf4*, *Sox2*, and *Oct4*) into adult rabbit ear fibroblasts. The resulting cells exhibited the cardinal

Table 1
Published studies on establishment of pluripotent stem cell lines from rabbit.

Year	Reference Number	Title	Special supplements in the media	Markers tested	Level of pluripotency	Level of chimerism
A. Embryonic stem cell lines						
1993	[46]	Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos	Murine leukemia inhibitory factor	Desmin	Differentiation in vivo and in vitro, normal karyotype	No chimera formation
1996	[47]	Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts	Murine leukemia inhibitory factor	AP	Alkaline phosphatase activity; differentiation in vivo and in vitro	The efficiency of chimera formation was low (5% of live-born), but the degree of chimerism, as assessed by coat color contribution, was high (10% to 50%)
2006	[44]	Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos	Human recombinant basic fibroblast growth factor	AP, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-10, TRA-1-81, Oct-4, EBAF, FGF4, TDGF1, ß-Tubulin, α-fetoprotein	Normal karyotype; alkaline phosphatase activity; differentiation in vivo and in vitro, genetic manipulation, production of nuclear transfer rabbit embryos	No chimera formation
2007	[10]	Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells	No supplemented special factor	SSEA-1, SSEA3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Oct4, AP, Nanog, SOX2, UTF-1, FGF, WNT, TGF	Normal karyotype; alkaline phosphatase activity; differentiation in vivo and in vitro	No chimera formation
2008	[48]	Culture and characterization of presumptive embryonic stem cell line isolated from New Zealand White rabbit embryos	Murine leukemia inhibitory factor	SSEA-1, Oct4, AP, SOX2	Alkaline phosphatase activity; differentiation in vivo and in vitro	No chimera formation
2008	[49]	Characterization, chromosomal assignment, and role of LIFR in early embryogenesis and stem cell establishment of rabbits	Murine leukemia inhibitory factor, human recombinant basic fibroblast growth factor	Oct4, SSEA-1, Nanog, CD9, AP, gp130	Alkaline phosphatase activity; differentiation in vivo and in vitro	No chimera formation
2008	[25]	Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research	Murine leukemia inhibitory factor; human recombinant basic fibroblast growth factor	Nanog, SSEA-1, SSEA-4, Oct4, SSEA-3, AP	Alkaline phosphatase activity; differentiation in vivo and in vitro, normal karyotype, telomerase activity	The efficiency of chimera formation was high (36% of live-born), however, based on The green fluorescent protein fluorescence detection the embroyonic stem cells did not contribute to any kind of tissues

(continued on next page)

Table 1
(continued).

Year	Reference Number	Title	Special supplements in the media	Markers tested	Level of pluripotency	Level of chimerism
2009	[27]	Characterization of embryonic stem cell lines derived from New Zealand white rabbit embryos	Murine leukemia inhibitory factor	Sox2, Nanog, Oct-4, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, AP, MAP2, desmin, GATA4, Jak1, Jak2, Jak3, Stat3, LIFR, gp130	Alkaline phosphatase activity; differentiation in vivo and in vitro	No chimera formation
2011	[41]	Cell-mediated transgenesis in rabbits: chimeric and nuclear transfer animals	Human leukemia inhibitory factor; human recombinant basic fibroblast growth factor	AP, Oct4, Rex1, Nanog, Terc, nodal, Foxd3, Dppa5, Bmp4, SSEA-1, SSEA-4, TRA-1–60, TRA-1–81	Alkaline phosphatase activity; differentiation in vivo and in vitro	The single live-born offspring showed evidence of low level coat color chimerism
B. Induced pluripotent stem cell lines						
2010	[26]	Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine	For culture of adult rabbit somatic cells: hepatocyte growth factor, epidermal growth factor. For iPSC induction and culture:murine leukemia inhibitory factor; human recombinant basic fibroblast growth factor	AP, SSEA-1, SSEA-4, Oct-4, Nanog, SSEA-3	Telomerase activity, normal karyotype, differentiation in vivo and in vitro, alkaline phosphatase activity	No chimera formation

AP, alkaline phosphatase; iPSC, induced pluripotent stem cell; SSEA, stage-specific embryonic antigen; TRA, tumor rejection antigen; UTF, undifferentiated embryonic cell transcription factor; FGF, fibroblast growth factor; WNT, wingless and integrase-1; TGF, tumor growth factor; gp, glycoprotein; CD, cluster of differentiation; MAP, mitogen activated protein; GATA, globin transcription factor; Dppa, developmental pluripotency associated; FoxD, forkhead box D; Rex1, reduced expression protein; Terc, telomerase RNA component; EBAF, endometrial bleeding-associated factor; TDGF, teratocarcinoma-derived growth factor.

features of nonmurine iPSCs, including the capacity for indefinite self-renewal in the presence of FGF2. Like their embryonic counterpart, riPSCs seem to have a restricted capacity to colonize the preimplantation embryo (i.e., to form chimeras) (Osteil et al., manuscript in preparation).

Recent studies have shown that riPSCs in culture, like human induced pluripotent stem cells, require basic FGF and hypoxic conditions to maintain them in the pluripotent state. While the reprogramming of rabbit somatic cells using human reprogramming factors is not very efficient, we cannot rule out the possibility that using rabbit-specific sequences of the reprogramming factors will improve the efficiency.

3.4. Chimera production with ESCs/iPSCs

The first chimeric rabbits were reported in 1974 by Gardner and Munro [79], and this breakthrough was followed by many more attempts. Yang and Foote used cells recovered at stages of development roughly equivalent to the recipient embryo by combining two morulae [80]. In 1980, ICM cells injected into Day-4 blastocysts [81] or fetal gonadal cells [82], or blastomeres from 8- to 16-cell stage embryos [83] injected into other 8- to 16-cell stage embryos resulted in chimeras. The generation of chimeras through blastocyst injection in rodents has been used to generate knockout animals, where gene targeted ESCs are used to transmit a ma-

nipulated genome through the germ line of the chimeric animal. ESC pluripotency, as determined by chimera production after blastocyst injection, has already been published for the mouse [84], and the generation of rabbit chimeras would benefit biomedical research by offering a genetically defined nonrodent model for human diseases.

Honda et al. [26] was the first to report the establishment of riPSCs but could not manage to generate rabbit chimeras from these iPSCs. However, Zakhartchenko and colleagues recently reported one live born ESC-derived rabbit chimera after injection of albino rESCs into 4- to 8-cell stage embryos of the Black Alaska rabbit breed [41]. However, the single live-born offspring, which showed evidence of low level coat color chimerism, died after 2 mo so that inheritance through the germ line could not be tested. Such a low rate of chimera generation may result either from the failure of ESCs to colonize the preimplantation embryo, or from the failure of incorporated ESCs to truly participate in embryo development because of competition with host cells, or from both.

4. Conclusion and the future

4.1. Progress toward understanding pluripotency using systems biology; biomedical applications will emerge

Progress in stem cell technology shows considerable promise for the future of biomedical research. ESCs and iPSCs can be considered the two sides of a single coin, where both have advantages and disadvantages. One of the most important potential applications of these cells is repair of diverse damaged tissues, and particularly those with limited ability for spontaneous repair. Not too long ago, organ transplantation was the only solution for this problem, and this is a technique that faces numerous obstacles, including shortage of compatible donors. ESCs and iPSCs might offer a solution to this problem as these cells have, given appropriate conditions, the potential to generate any type of somatic cell or tissue. Moreover, because iPSCs can be patient-derived to prevent any risk of transplantation rejection, this would also open the door to the generation of pluripotent stem cells without sacrificing embryos. However, ESCs might be necessary in cases, such as a heart attack or a stroke, when there is no time to generate patient-specific iPSCs, which is time-consuming, and where an off-the-shelf product is required. iPSCs have the ability to proliferate indefinitely in vitro, creating an unlimited source of cells, and the early results of iPSC differentiation studies are promising. For example, human fibroblasts have been successfully turned into iPSCs that were then differentiated into insulin-producing cells for the treatment of diabetes [85]. Mouse and human ESCs and iPSCs have been differentiated into cardiovascular cells with high efficiency [86] and, recently, the ability of human iPSCs and ESCs to differentiate into neural cells was compared, and it transpired that both cell types follow the same steps and time-course during differentiation [87]. In the rabbit, Honda et al. [26] have differentiated ESCs toward neural cells, while myocardial-like cells have also been generated from rabbit ESCs by withdrawal of LIF [88].

Rabbit ESCs and iPSCs might become the basis of important models for human disease processes. To date, several lines of putative ESCs and iPSCs have been described in the rabbit. All of these lines express stem cell-associated markers and exhibit self-renewal and pluripotency in vitro, but future validation of rabbit pluripotent stem cells would benefit greatly from the validation of a reliable panel of molecular markers specific to the characteristics of pluripotent cells in the developing rabbit embryo. Indeed, the identification and characterization of the putative pluripotency genes in the rabbit is progressing. Using rabbit-specific pluripotency genes might help to more precisely characterize rESCs and riPSCs and aid in the development of methods to more efficiently reprogram somatic cells to generate iPSCs. Identification and sequencing of rabbit-specific pluripotency genes will also aid the production of recombinant proteins and generation of specific antibodies to further characterize expression of pluripotency factors at the protein level. The ultimate goal is to resolve the difficulties in this species and produce well characterized rabbit pluripotent stem cell lines and germ line chimeras with similar efficiency to the mouse, so that they can truly be used for the envisaged biomedical applications. Moreover, the understanding of the rabbit pluripotency regulation might provide further information to help overcome similar difficulties in other species, including the pig, cow, small ruminants, and many endangered species.

Acknowledgments

This study was financed by EU FP7 (PartnErS, PIAP-GA-2008-218205; RabPstem, PERG07-GA-2010-268422; PluriSys, HEALTH-2007-B-223485; AniStem, PIAP-GA-2011-286264), EU COST Action FA0702 “GEM-

INI"; NKTH-OTKA-EU-7KP HUMAN-MB08-C-80-205; NKFP_BONUS HU_08/2-2009-0008; Plurabbit, OMFB-00130-00131/2010 ANR-NKTH/09-GENM-010-01; OTKA K77913; Hypharm company; Région Rhône-Alpes (CIBLE).

References

[1] Graur D, Duret L, Gouy M. Phylogenetic position of the order lagomorpha (rabbits, hares and allies). Nature 1996;379:333–5.
[2] Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Mochida K, Hatori M, Okada H, et al. Differential development of rabbit embryos following microinsemination with sperm and spermatids. Mol Reprod Dev 2005;72:411–7.
[3] Fan J, Watanabe T. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. Pharmacol Ther 2003; 99:261–82.
[4] Kondo M, Sakai T, Komeima K, Kurimoto Y, Ueno S, Nishizawa Y, et al. Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009;50: 1371–7.
[5] Marian AJ, Wu Y, Lim DS, McCluggage M, Youker K, Yu QT, et al. A transgenic rabbit model for human hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest 1999;104:1683–92.
[6] Wang S, Shen Y, Yuan X, Chen K, Guo X, Chen Y, et al. Dissecting signaling pathways that govern self-renewal of rabbit embryonic stem cells. J Biol Chem 2008;283:35929–40.
[7] Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. J Biol Chem 2005;280:24731–7.
[8] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell 2005;122:947–56.
[9] Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Nat Genet 2006; 38:431–40.
[10] Wang S, Tang X, Niu Y, Chen H, Li B, Li T, et al. Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. Stem Cells 2007;25:481–9.
[11] Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell 2008;132: 567–82.
[12] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006;126:663–76.
[13] Tancos Z, Ujhelly O, Pirity MK, Dinnyes A. Isolation of pluripotency genes to generate rabbit induced pluripotent stem cells. Reproduction Fertility and Development 2012;24:223–4 (abstr).
[14] Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific microRNAs. Dev Cell 2003;5:351–8.
[15] Lakshmipathy U, Love B, Goff LA, Jörnsten R, Graichen R, Hart RP, et al. MicroRNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. Stem Cells Dev 2007;16:1003–16.
[16] Lichner Z, Páll E, Kerekes A, Pállinger E, Maraghechi P, Bosze Z, et al. The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells. Differentiation 2011;81:11–24.
[17] Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. Dev Biol 2004;270:488–98.
[18] Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. Nat Genet 2007;39:380–5.
[19] Card DA, Hebbar PB, Li L, Trotter KW, Komatsu Y, Mishina Y, et al. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. Mol Cell Biol 2008;28:6426–38.
[20] Bar M, Wyman SK, Fritz BR, Qi J, Garg KS, Parkin RK, et al. MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. Stem Cells 2008;26:2496–505.
[21] Barroso-delJesus A, Romero-López C, Lucena-Aguilar G, Melen GJ, Sanchez L, Ligero G, et al. Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. Mol Cell Biol 2008;28:6609–19.
[22] Zovoilis A, Nolte J, Drusenheimer N, Zechner U, Hada H, Guan K, et al. Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells have similar microRNA profiles. Mol Hum Reprod 2008;14:521–9.
[23] Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. Cell Stem Cell 2011;8:376–88.
[24] Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Blelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. Nat Biotechnol 2009;27:459–61.
[25] Honda A, Hirose M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Shimozawa N, et al. Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. Reprod Biomed Online 2008;17:706–15.
[26] Honda A, Hirose M, Hatori M, Matoba S, Miyoshi H, Inoue K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. J Biol Chem 2010;285:31362–9.
[27] Intawicha P, Ou YW, Lo NW, Zhang SC, Chen YZ, Lin TA, et al. Characterization of embryonic stem cell lines derived from New Zealand white rabbit embryos. Cloning Stem Cells 2009;11:27–38.
[28] Honda A, Hirose M, Ogura A. Basic FGF and activin/nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. Exp Cell Res 2009;315:2033–42.
[29] Oliver C, Jamur MC. Immunocytochemical methods and protocols. Methods Mol Biol 2010;588:iv–v.
[30] Jamur MC, Oliver C. Permeabilization of cell membranes. Methods Mol Biol 2010;588:63–6.
[31] Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. Biol Reprod 1988;39:657–64.
[32] Collas P, Robl JM. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. Biol Reprod 1990;43: 877–84.
[33] Collas P, Robl JM. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. Biol Reprod 1991;45:455–65.
[34] Yang X, Jiang S, Kovács A, Foote RH. Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. Biol Reprod 1992;47:636–43.
[35] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 1997;385:810–3.

ARTICLE IN PRESS

[36] Challah-Jacques M, Chesne P, Renard JP. Production of cloned rabbits by somatic nuclear transfer. Cloning Stem Cells 2003; 5:295–9.
[37] Chesné P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nat Biotechnol 2002;20:366–9.
[38] Li S, Chen X, Fang Z, Shi J, Sheng HZ. Rabbits generated from fibroblasts through nuclear transfer. Reproduction 2006;131: 1085–90.
[39] Yang F, Hao R, Kessler B, Brem G, Wolf E, Zakhartchenko V. Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation. Reproduction 2007;133:219–30.
[40] Meng Q, Polgar Z, Liu J, Dinnyes A. Live birth of somatic cell-cloned rabbits following trichostatin A treatment and cotransfer of parthenogenetic embryos. Cloning Stem Cells 2009;11:203–8.
[41] Zakhartchenko V, Flisikowska T, Li S, Richter T, Wieland H, Durkovic M, et al. Cell-mediated transgenesis in rabbits: chimeric and nuclear transfer animals. Biol Reprod 2011;84: 229–37.
[42] Li S, Guo Y, Shi J, Yin C, Xing F, Xu L, et al. Transgene expression of enhanced green fluorescent protein in cloned rabbits generated from in vitro-transfected adult fibroblasts. Transgenic Res 2009;18:227–35.
[43] Shi LH, Miao YL, Ouyang YC, Huang JC, Lei ZL, Yang JW, et al. Trichostatin A (TSA) improves the development of rabbit-rabbit intraspecies cloned embryos, but not rabbit-human interspecies cloned embryos. Dev Dyn 2008;237:640–8.
[44] Fang ZF, Gai H, Huang YZ, Li SG, Chen XJ, Shi JJ, et al. Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos. Exp Cell Res 2006;312:3669–82.
[45] Gocza E, Bosze Z. Derivation and characterization of rabbit embryonic stem cells. In: Rabbit Biotechnology, Houdebine L-M, Fan J (Eds.). Springer, 2009, pp. 63–94.
[46] Graves KH, Moreadith RW. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. Mol Reprod Dev 1993;36:424–33.
[47] Schoonjans L, Albright GM, Li JL, Collen D, Moreadith RW. Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts. Mol Reprod Dev 1996;45:439–43.
[48] Intawicha P, Ou YW, Zhang SC, Su HL, Guu HF, Chen MJ, et al. Culture and characterization of presumptive embryonic stem cell line isolated from New Zealand White rabbit embryos. Cell Res 2008;18:s38.
[49] Catunda AP, Gócza E, Carstea BV, Hiripi L, Hayes H, Rogel-Gaillard C, et al. Characterization, chromosomal assignment, and role of LIFR in early embryogenesis and stem cell establishment of rabbits. Cloning Stem Cells 2008;10:523–34.
[50] Hsieh YC, Intawicha P, Lee KH, Chiu YT, Lo NW, Ju JC. LIF and FGF cooperatively support stemness of rabbit embryonic stem cells derived from parthenogenetically activated embryos. Cell Reprogram 2011; 13: 241–55.
[51] Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. Cell 2008;135:1287–98.
[52] Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. Nature 2008;453:519–23.
[53] Nichols J, Silva J, Roode M, Smith A. Suppression of erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. Development 2009;136:3215–22.
[54] Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell Stem Cell 2007;1:55–70.
[55] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature 2007;448: 313–7.
[56] Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. Nature 2007;448:318–24.
[57] Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. Cell Stem Cell 2008;2:151–9.
[58] Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, Christodoulou C, Thomas DD, Gostissa M, et al. Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. Stem Cells 2010;28: 64–74.
[59] Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. Cell Stem Cell 2008;2:230–40.
[60] Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, Saha K, Gao Q, Mitalipova M, et al. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:157–62.
[61] Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. Stem Cells 2009;27: 543–9.
[62] Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. Nature 2009;458:771–5.
[63] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. Cell 2009; 136:964–77.
[64] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Nature 2009;458: 766–70.
[65] Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. Nat Methods 2009;6:363–9.
[66] Izsvák Z, Ivics Z. Sleeping beauty transposition: biology and applications for molecular therapy. Mol Ther 2004;9:147–56.
[67] Muenthaisong S, Ujhelly O, Varga E, Carstea AC, Ivics Z, Pirity M, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem (iPS) cells from various genetic background by sleeping beauty (SB) transposon mediated gene transfer. Reprod Fertil Dev 2011;23:292.
[68] Muenthaisong S, Ujhelly O, Varga E, Ivics Z, Pirity M, Dinnyes A. Generation of induced pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by sleeping beauty transposon. Transgenic Research 2010;19:344 (abstr).
[69] Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell Stem Cell 2009;4:381–4.

ARTICLE IN PRESS

[70] Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. Cell Stem Cell 2010;7:618–30.
[71] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007;131:861–72.
[72] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 2007;318:1917–20.
[73] Park IH, Lerou PH, Zhao R, Huo H, Daley GQ. Generation of human-induced pluripotent stem cells. Nat Protoc 2008;3: 1180–6.
[74] Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. Cell Stem Cell 2009;4:16–9.
[75] Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. Cell Stem Cell 2008;3:587–90.
[76] Luo J, Suhr ST, Chang EA, Wang K, Ross PJ, Nelson LL, et al. Generation of leukemia inhibitory factor and basic fibroblast growth factor-dependent induced pluripotent stem cells from canine adult somatic cells. Stem Cells Dev 2011;20:1669–78.
[77] Nagy K, Sung HK, Zhang P, Laflamme S, Vincent P, Agha-Mohammadi S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. Stem Cell Rev 2011;7:693–702.
[78] Zhou L, Wang W, Liu Y, Fernandez de Castro J, Ezashi T, Telugu BP, et al. Differentiation of induced pluripotent stem cells of swine into rod photoreceptors and their integration into the retina. Stem Cells 2011;29:972–80.
[79] Gardner RL, Munro AJ. Successful construction of chimaeric rabbit. Nature 1974;250:146–7.
[80] Yang XZ, Foote RH. Production of chimeric rabbits from morulae by a simple procedure. Gamete Res 1988;21:345–51.
[81] Babinet C, Bordenave GR. Chimaeric rabbits from immunosurgically-prepared inner-cell-mass transplantation. J Embryol Exp Morphol 1980;60:429–40.
[82] Moens A, Betteridge KJ, Brunet A, Renard JP. Low levels of chimerism in rabbit fetuses produced from preimplantation embryos microinjected with fetal gonadal cells. Mol Reprod Dev 1996;43:38–46.
[83] Bodó S, Gócza E, Révay T, Hiripi L, Carstea B, Kovács A, et al. Production of transgenic chimeric rabbits and transmission of the transgene through the germline. Mol Reprod Dev 2004; 68:435–40.
[84] Kidder BL, Oseth L, Miller S, Hirsch B, Verfaillie C, Coucouvanis E. Embryonic stem cells contribute to mouse chimeras in the absence of detectable cell fusion. Cloning Stem Cells 2008; 10:231–48.
[85] Kunisada Y, Tsubooka-Yamazoe N, Shoji M, Hosoya M. Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. Stem. Cell Res 2012;8:274–84.
[86] Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, et al. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A. PLoS One 2011;6:e16734.
[87] Hu BY, Weick JP, Yu J, Ma LX, Zhang XQ, Thomson JA, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:4335–40.

Titre de la thèse : Etude de la pluripotence des cellules souches embryonnaires chez le lapin.
Doctorant : Pierre Osteil

Résumé de la thèse :

Les cellules souches embryonnaires (ESCs) sont issues de la masse cellulaire interne (ICM) de blastocystes pré-implantatoires. Elles sont pluripotentes c'est-à -dire capables de se différencier dans les trois lignages embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) et de s'autorenouveller, c'est-à-dire de se multiplier indéfiniment en culture. Chez la souris, ces cellules (mESCs) sont à la base des techniques de transgénèse permettant des modifications génétiques ciblées. Chez l'Homme ces cellules (hESCs) représentent un grand espoir en médecine régénérative pour traiter des maladies dégénératives comme les maladies de Parkinson ou de Huntington. Le modèle le plus pertinent de l'espèce humaine est le singe. Cependant l'expérimentation sur ces deux espèces est soumise à une règlementation très stricte. C'est pourquoi il est nécessaire de développer des modèles alternatifs. C'est dans ce cadre que s'inscrit le lapin, qui est phylogénétiquement plus proche de l'Homme que ne l'est la souris. En effet, il est de plus en plus évident que le seul modèle murin ne convient pas pour l'étude de certaines maladies humaines. De plus, il est à noter que le développement embryonnaire de la souris présente des caractéristiques uniques au sein de la classe des mammifères et n'est donc pas représentatif. Chez la souris, il existe deux états de pluripotence capturés *in vitro* : (*i*) les mESCs qui sont capables de coloniser un embryon receveur et dont l'autorenouvellement est assuré par le Leukemia Inhibitory Factor (LIF) ; et (*ii*) les mEpiSCs (Epiblast Stem Cells) qui sont maintenues par le Fibrobast Growth factor (FGF) et l'Activine et qui sont incapables de former des embryons chimères. Les mESCs sont dites naïves et les mEpiSCs amorcées. Les ESCs des autres mammifères sont dites amorcées car elles possèdent principalement des caractéristiques spécifiques aux mEpiSCs.

Mon projet de thèse a eu pour but d'étudier la pluripotence dans les cellules souches embryonnaires de lapin (rbESCs) dans le but d'utiliser ces cellules en transgénèse pour produire des animaux transgéniques modèles de maladie humaine. Mon travail a tout d'abord consisté en la dérivation et la stabilisation de lignées de rbESC dans différentes conditions de culture et notamment en présence de FGF ou de LIF. Toutes les lignées obtenues présentaient bien les propriétés cardinales de cellule souche pluripotente (PSC), à savoir : (*i*) l'activité phosphatase alcaline ; (*ii*) l'expression des gènes de pluripotence *Oct4* et *Nanog*, ainsi que les marqueurs de surface spécifiques des mESCs ou hESCs ; (*iii*) un caryotype normal et (*iv*) la formation de tératome composé de cellules des trois feuillets embryonnaires, lorsqu'elles sont injectées dans la capsule sous-rénale de souris immuno-déprimées. J'ai ensuite caractérisé ces différentes lignées d'un point de vue moléculaire mais aussi fonctionnel, en les comparants à plusieurs lignées de cellule souche pluripotente induite (iPSCs) obtenues dans notre laboratoire par reprogrammation de fibroblastes de peau d'une lapine adulte. Les résultats de ces analyses ont montré que les lignées de rbiPSC-FGF présentaient plus de caractéristiques propres aux cellules naïves que les lignées de rbESC-FGF ou rbESC-LIF, la principale différence étant la faible capacité à coloniser l'ICM d'un embryon receveur. Ces analyses sont regroupées au sein de l'article que notre laboratoire a publié en 2013 dans *Biology Open* (Osteil *et al.*, 2013). Mon travail s'est ensuite orienté sur l'amélioration des conditions de dérivation et de culture des rbESCs en présence de LIF afin d'obtenir des cellules naïves, aptes à coloniser un embryon receveur. Ces expériences ont abouti à la dérivation de différentes lignées de rbESC-ALF, capables de croître après dissociation unicellulaire dans un milieu contenant du LIF. L'analyse de ces nouvelles lignées a montré qu'elles présentaient beaucoup plus de caractéristiques naïves que les lignées de rbESC-FGF, mais qu'elles n'étaient cependant pas dépendantes du LIF, mais toujours du FGF et de l'Activine sécrétés par les cellules nourricières. Néanmoins, les lignées de rbESC-ALF étaient capables de répondre au LIF et possédaient une meilleure capacité de colonisation des embryons de lapin. Leur étude approfondie m'a conduit à étudier le rôle du LIF dans la dérivation des rbESCs. L'ensemble de ces résultats a permis d'établir des bases solides pour la compréhension de la pluripotence et pour la dérivation d'ESCs naïves chez un autre mammifère que la souris.