

# Les cellules souches embryonnaires de lapin : État des lieux et perspectives

P. OSTEIL<sup>1</sup>, T. JOLY<sup>2</sup>, M. AFANASSIEFF<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Cellule Souche et Cerveau, INSERM U846, INRA USC1361, 18 avenue du Doyen Lépine,  
69500 Bron, France

<sup>2</sup>ISARA-Lyon, VetAgroSup, UPSP ICE, 69280 Marcy l'Etoile, France

**Résumé** - L'établissement de lignées de cellules souches embryonnaires (ESCs) de souris a permis de nombreuses avancées technologiques dans le domaine de la génétique. La création d'animaux mutés sur un ou plusieurs gènes et l'étude phénotypique qui en découle, ont amené les scientifiques à découvrir de nombreux traitements pour l'Homme. Mais certaines maladies ne sont pas équivalentes chez la souris et l'Homme, comme l'athérosclérose, car les processus physiologiques subjacents sont différents. C'est pourquoi il est très important d'étudier ces maladies chez d'autres mammifères. Le lapin s'avère être un très bon candidat car il est proche génétiquement et physiologiquement de l'Homme. Les ESCs permettraient la création de lapins transgéniques, modèles pour l'étude de maladies humaines, et faciliteraient la production de lapins bioréacteurs, c'est-à-dire des animaux produisant des molécules d'intérêt pharmaceutique dans leur lait. Cette communication fait le point sur l'avancement des recherches sur les ESCs et les techniques de transgénèse chez le lapin.

**Abstract - Rabbit embryonic stem cells: State of art and prospects** - The establishment of mouse embryonic stem cells (ESCs) allowed numerous technological breakthroughs in the field of the genetic. The creation and the study of transgenic mice with one or several gene mutations brought scientists to discover numerous treatments for human diseases. Nevertheless, some diseases give rise to various symptoms in mice and in Human, as atherosclerosis, because the physiological subjacent processes are different. Therefore it is very important to study these diseases in other animal models. The rabbit turns out to be a very good candidate because he is close genetically and physiologically to Human. The ESC derivation would allow the creation of transgenic rabbit models to study human diseases, and would lighten the production of rabbit bioreactors, that are animals producing molecules of pharmaceutical interest in their milk. This review reports on the state of art on ESC researches and transgenesis techniques in the rabbit.

## Introduction

Les cellules souches pluripotentes (PSCs) sont des cellules capables de se différencier dans les trois lignages embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) et de s'autorenouveler, c'est-à-dire de se multiplier indéfiniment en culture sans perdre leur caractère pluripotent. Chez la souris, ces cellules sont à la base des techniques de transgénèse permettant des modifications génétiques ciblées. Chez l'Homme ces cellules représentent un grand espoir en médecine régénérative pour traiter des maladies dégénératives comme les maladies de Parkinson ou de Huntington. Chez des animaux domestiques, l'obtention de PSCs permettrait de développer des techniques de transfert de gènes et d'étudier, par des approches de génomique fonctionnelle, diverses grandes fonctions physiologiques d'intérêt agronomique (reproduction, lactation, photopériodisme, croissance musculaire). Chez le lapin, de tels outils biotechnologiques présentent en plus un intérêt en recherche médicale, car c'est une espèce plus proche phylogénétiquement de l'Homme que ne l'est la souris. La création de lapins transgéniques permettrait donc d'obtenir des modèles pour l'étude de certaines maladies humaines, telles que l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires (Duranton *et al.* 2012), modèles plus pertinents que ne le sont les souris transgéniques utilisées actuellement. Par ailleurs, les PSCs présenteraient aussi un enjeu économique non

négligeable chez le lapin, en facilitant les techniques, et en diminuant le coût de création d'animaux réacteurs biologiques, c'est-à-dire capables de produire dans leur lait des protéines d'intérêt pharmaceutique (Houdebine, 1995). Il existe deux types différents de PSCs qui permettent de créer des souris transgéniques : (i) les cellules souches embryonnaires (ESCs) qui sont issues de la masse cellulaire interne (ICM) d'embryons au stade blastocyste ; et (ii) les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) qui proviennent de la reprogrammation génétique de cellules somatiques adultes.

L'objectif de cette communication est de faire le point sur l'état d'avancement des recherches sur les PSCs, et plus particulièrement sur les méthodes de dérivations des ESCs et les techniques de transgénèse chez le lapin.

## 1. Les propriétés des PSCs

Les PSCs possèdent trois propriétés qui les distinguent de toutes les autres cellules somatiques : l'autorenouvellement, la pluripotence et la tumorigénèse.

### 1.1. L'autorenouvellement.

Premièrement, les PSCs sont immortelles, tant qu'elles sont maintenues dans des conditions de culture adéquates. Elles sont ainsi capables de se multiplier indéfiniment *in vitro* en conservant leur état indifférencié et leur capacité de différenciation grâce

à une régulation spécifique des phénomènes d'apoptose et de sénescence. Elles se multiplient très rapidement et possèdent un cycle cellulaire caractéristique avec une phase G1 très courte et une régulation de la transition G1-S atypique (Burdon *et al.*, 2002).

### 1.2. La pluripotence.

La seconde propriété des PSCs est la capacité d'une cellule à se différencier dans tous les types cellulaires qui constituent un organisme adulte, y compris la lignée germinale. On étudie cette capacité *in vitro* par la formation de corps embryoïdes. Ce sont des structures tridimensionnelles obtenues lors de culture des cellules en condition non adhérente et composées de cellules des différents feuilletts embryonnaires (Keller, 1995). Dans le cas des PSCs murines, on étudie aussi cette capacité *in vivo* en injectant les cellules dans un embryon pré-implantatoire au stade blastocyste. Les cellules sont alors capables de coloniser l'ICM de l'embryon receveur et de participer au développement embryonnaire pour former des chimères (Bradley *et al.*, 1984). On distingue la pluripotence de la totipotence qui est la capacité à former un individu entier. Seuls, le zygote et les blastomères des tous premiers stades embryonnaires sont totipotents. Les PSCs murines ne participent pas au développement du trophoctoderme de l'embryon, et sont donc incapables de générer un individu entier, mais elles conservent un potentiel de différenciation très élevé car elles peuvent participer à la formation de l'ensemble des tissus embryonnaires.

### 1.3. La tumorigénèse.

Les PSCs sont tumorales et sont capables de former des tératomes lorsqu'elles sont injectées dans des testicules de souris adultes immunodéprimées (Martin, 1981). Ce sont les seules cellules tumorales qui ne présentent pas d'altérations génétiques. Cette propriété est liée à leur régulation particulière du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la sénescence.

### 1.4. Le « noyau de pluripotence ».

Les trois propriétés des PSCs sont contrôlées par un panel de gènes spécifiquement régulés par six gènes principaux qui constituent ce que l'on appelle le « noyau de pluripotence »: *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Klf2*, *Esrrb*, *Tbx3*. Ces gènes s'autorégulent entre eux et activent l'expression de nombreux gènes essentiels pour l'autorenouvellement incluant des facteurs de transcription et de signalisation cellulaire. Ils inhibent également des gènes de différenciation permettant ainsi le maintien de la pluripotence.

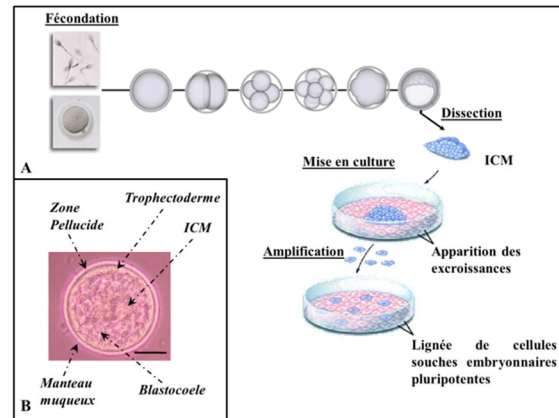
## 2. L'obtention des PSCs

### 2.1. La dérivation des ESCs.

L'établissement de lignées d'ESCs correspond à la capture et à la stabilisation *in vitro* de l'état de pluripotence des cellules issues de l'ICM d'un embryon pré-implantatoire au stade blastocyste (Evans and Kaufman, 1981 ; Martin, 1981) (Figure 1). Il faut cependant prendre conscience que ces cellules

n'existent que quelques heures dans cet état lors du développement embryonnaire et qu'elles ont très vite tendance à se différencier lors de leur mise en culture. La difficulté réside donc dans la définition des conditions de culture permettant de maintenir la pluripotence des cellules de l'ICM.

**Figure 1 : Dérivation des ESCs. A) Développement embryonnaire et établissement d'une lignée de ESCs; B) Un embryon de lapin au stade blastocyste.**



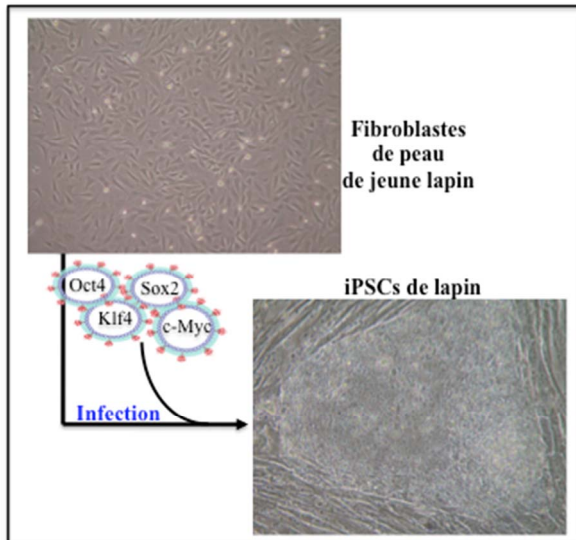
Le principe de la dérivation est de prélever les ICMs de blastocystes et de les mettre individuellement en culture sur des cellules nourricières, dans notre cas des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) dont la croissance a été inactivée par un produit chimique (Mitomycine C). Plus précisément, il faut tout d'abord éliminer le manteau muqueux et la zone pellucide, à l'aide d'un traitement enzymatique (Pronase) et d'une dissociation manuelle grâce à des capillaires en verre. Ensuite, les embryons sont disséqués manuellement pour séparer le trophoctoderme qui a été fragilisé par le traitement enzymatique et l'ICM. Ce dernier est enfin mis en culture sur des MEFs, dans un milieu riche qui va favoriser la croissance des cellules de l'ICM. Celles-ci vont proliférer pour donner des excroissances cellulaires ; c'est à dire des regroupements de cellules très serrées qui poussent en deux dimensions. Le repiquage et la dissociation manuelle de ces excroissances en petits amas d'une dizaine de cellules sont réalisés après 5 à 7 jours de culture. Ces amas cellulaires sont replacés sur des MEFs fraîches et sont à l'origine d'une nouvelle lignée d'ESCs. Les premières lignées stables d'ESCs de lapin ont été dérivées 25 ans après les premières ESCs murines, par deux équipes chinoise (Wang *et al.*, 2007) et japonaise (Honda *et al.*, 2009) à partir d'embryons de lapin New Zealandais.

### 2.2. L'obtention des iPSCs.

Les iPSCs sont obtenues par reprogrammation de cellules somatiques adultes, telles que des fibroblastes de peau, en PSCs grâce à la surexpression de gènes spécifiques apportés dans les cellules par des vecteurs dérivés de virus (Takahashi and Yamanaka, 2006). Cette technique qui modifie génétiquement les cellules, a un potentiel très important en médecine régénérative et a permis à son découvreur de recevoir

le prix Nobel de Médecine en 2012. Chez le lapin, des lignées d'iPSCs ont été obtenues en infectant soit des cellules de foie ou d'intestin (Honda *et al.*, 2010), soit des fibroblastes d'oreille (Osteil *et al.* 2013), avec des rétrovirus modifiés pour ne pas se reproduire et véhiculant quatre gènes (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* et *cMyc*) (Figure 2).

**Figure 2 : Obtention d'iPSCs de lapin.**

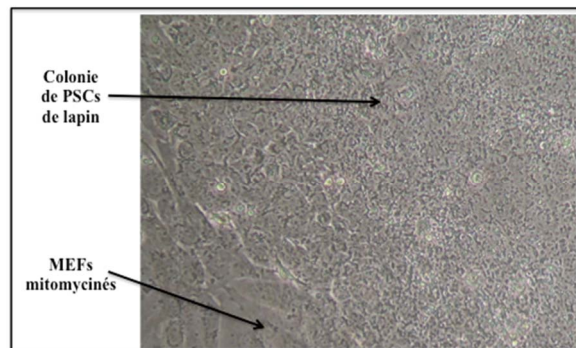


La reprogrammation se produit lentement (environ 6 semaines) et aléatoirement dans quelques cellules qui expriment de façon adéquate les transgènes apportés par les virus. L'efficacité de reprogrammation est très faible ( $1/6.10^6$ ), mais les quelques cellules qui perdent leurs propriétés de cellules de foie, d'intestin ou de peau, sont à l'origine de lignées d'iPSCs qui présentent les mêmes propriétés que les lignées d'ESC de lapin.

### 2.3. La culture des PSCs de lapin.

Les ESCs et iPSCs de lapin forment des colonies plates composées de petites cellules très compactes qui ressemblent beaucoup aux PSCs de primate (Figure 3).

**Figure 3 : Morphologie des PSCs de lapin.**



Elles croissent en coculture sur des MEFs mitomycinés dans un milieu contenant des facteurs de croissance appropriés : soit de l'activine et du bFGF (basic Fibroblaste Growth Factor) comme les PSCs de primate, soit du LIF (Leukemia Inhibitory factor)

comme les PSCs de rongeur. Afin de les amplifier, les colonies sont dissociées à l'aide d'un traitement enzymatique (Accutase ou Trypsine); les cellules en suspension unicellulaire sont alors comptées et ensemencées dans une nouvelle boîte de culture contenant des MEFs mitomycinés. C'est ce qu'on appelle un passage cellulaire.

### 3. Les techniques de transgénèse

Il existe actuellement cinq techniques permettant de produire des souris transgéniques : l'injection d'ADN nu dans l'ovocyte fécondé, l'infection d'embryon avec des vecteurs viraux, la microinjection de PSCs dans un embryon précoce receveur, le transfert nucléaire dans un ovocyte énucléé, l'utilisation d'enzymes ZFN ou TALEN.

#### 3.1. L'injection d'ADN nu.

C'est la seule technique utilisée actuellement pour obtenir des lapins transgéniques et notamment des lapins bioréacteurs (Hiripi *et al.*, 2003). Elle consiste en l'injection d'un transgène sous forme d'une séquence d'ADN dans le pronucléus mâle d'un ovocyte fécondé. Le fragment d'ADN va s'intégrer au hasard dans le génome du zygote au cours des divisions cellulaires. Cette technique permet d'obtenir des lapereaux chimériques qui seront à l'origine d'une lignée de lapin transgénique si leurs cellules germinales ont bien intégré le transgène. Elle pose cependant des problèmes d'efficacité (<5%), de coût et de sécurité car les transgènes sont intégrés de façon aléatoire et en plusieurs exemplaires et peuvent donc entraîner des mutations ou des dysfonctionnements géniques.

#### 3.2. L'infection d'embryons.

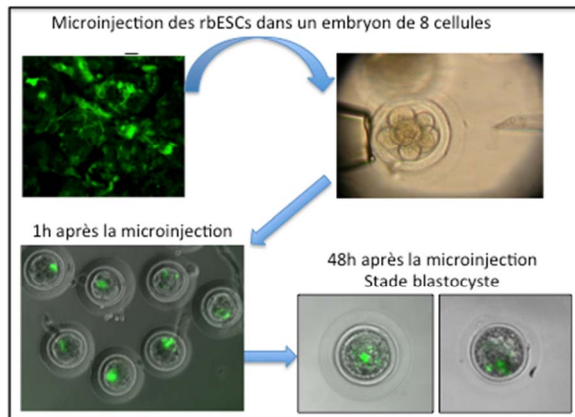
C'est une méthode qui a été beaucoup employée chez les rongeurs avant le développement des PSCs, car le transgène est véhiculé par un rétrovirus modifié de façon à éviter tout risque de propagation virale tout en utilisant les propriétés d'intégration de l'ADN virale dans la cellule infectée. Dans ce cas, le rétrovirus est injecté sous la membrane pellucide des embryons et le transgène va s'intégrer dans le génome des cellules infectées dans des sites préférentiels et en une seule copie. Cette technique a permis d'obtenir des lapereaux chimériques, mais avec un très faible pourcentage de transmission germinale (Hiripi *et al.*, 2010).

#### 3.3. La microinjection de PSCs.

L'intérêt des PSCs en transgénèse est la réduction du coût et l'augmentation de la sécurité et de la précision des modifications génétiques réalisées. En effet, les PSCs peuvent être modifiées génétiquement *in vitro* et triées selon des insertions, mutations ou délétions créées ou en fonction des expressions spécifiques de tissu souhaitées, avant d'être implantées dans un embryon receveur. Ce sont donc des outils biotechnologiques très puissants chez les rongeurs. Cependant chez le lapin, comme chez les autres espèces étudiées, aucune lignée de PSCs n'a pu jusqu'à présent coloniser un embryon receveur de

façon suffisamment importante pour produire une chimère somatique et germinale, et être à l'origine d'une lignée transgénique (Figure 4) (Osteil *et al.* 2013). Les recherches actuelles visent donc à augmenter les capacités de colonisation des PSCs pour obtenir des lapereaux chimériques.

**Figure 4 : Colonisation d'embryons de lapin par des ESCs marquées avec un fluorochrome vert.**



### 3.4. Le transfert nucléaire.

Il est possible d'obtenir un lapereau cloné par transfert du noyau d'une cellule somatique dans un ovocyte énucléé (Chesné *et al.*, 2002), mais cette technique est difficile à mettre en œuvre, peu efficace et très coûteuse. Il est cependant probable que cette méthode puisse être facilitée par l'utilisation des noyaux de PSCs modifiées génétiquement et triées *in vitro*. On obtiendrait alors directement un lapereau transgénique sans avoir de lapin chimère intermédiaire.

### 3.5. Les enzymes ZFN ou TALEN.

Cette technologie très récente permet de modifier efficacement et directement le génome d'un embryon à l'aide d'enzymes capables de reconnaître une séquence spécifique d'ADN et de la couper. Deux types d'enzymes sont utilisées en transgénèse: les ZFNs (Zinc Finger Nucleases) et les TALENs. Elles ont ainsi permis d'obtenir des lapereaux transgéniques (Hiripi, 2013), mais cette nouvelle technique n'est pour l'instant utilisable que pour réaliser des délétions, et donc pour inhiber un gène.

## Conclusion

Les PSCs (ESCs et iPSCs) sont des outils biotechnologiques très performants pour créer des lignées de souris transgéniques. Les lignées de PSCs de lapin dont les résultats ont été publiés jusqu'à présent ont une faible capacité de colonisation d'un embryon receveur et ne peuvent pas être employées en transgénèse chez cette espèce. Les recherches actuelles visent donc à comprendre les mécanismes moléculaires en jeu dans ce phénomène de colonisation, afin d'améliorer les propriétés et les conditions de production de ces cellules pour obtenir des PSCs de lapin utilisables en transgénèse.

## Remerciements

Pierre Osteil bénéficie d'une bourse de thèse cofinancée par l'entreprise Hypharm et l'INRA (PhD Grant INRA/HyPharm n° 04012010).

## Références

- 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.
- BURDON T., SMITH A., and SAVATIER P. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in Cell Biology*, 12: 432-438.
- CHESNÉ P., ADENOT P.G., VIGLIETTA C., BARATTE M., BOULANGER L, AND RENARD J.P. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology*, 20:366-369.
- DURANTHON V., BEAUJEAN N., BRUNNER M., ODENNING K.E., SANTOS A.N., KACSKOVICS I., HIRIPI L., WEINSTEIN E.J., AND BOSZE Z. 2012. On the Emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. *Transgenic Res.*, 21(4): 699-713.
- EVANS M.J., AND KAUFMAN M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
- HIRIPI L., MAKOVICS F., HALTER R., BARANYI M., PAUL D., CARNWATH J.W., BOSZE Z., AND NIEMANN H. 2003. Expression of active human blood clotting factor VIII in mammary gland of transgenic rabbits. *DNA Cell Biol.*, 22(1): 41-45.
- HIRIPI L., NEGRE D., COSSET F.L., KVELL K., CZÖMPÖLY T., BARANYI M., GOCZA E., HOFFMANN O., BENDER B., AND BOSZE Z. 2010. Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector. *Transgenic Res.*, 19(5): 799-808.
- HIRIPI L. 2013. The potential of ZNF and TALEN nucleases in rabbit transgenesis. *GRB-Net Cost Action Meeting, Gödöllő*, 26-27th March 2013.
- 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. *Experimental Cell Research*, 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 rabbit: potential experimental models for human regenerative medicine. *J. Biol. Chem.*, 285(41): 31362-31369.
- HOUEBINE L.M. 1995. The production of pharmaceutical proteins from milk of transgenic animals. *Reprod. Nutr. Dev.* 35(6):609-617.
- KELLER G.M. 1995. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Current opinion in cell biology*, 7:862-869.
- MARTIN G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS*, 78:7634-7638.
- OSTEIL P., TAPPONNIER Y., MARKOSSIAN S., GODET M., SCHMALTZ-PANNEAU B., JOUINEAU L., CABAU C., JOLY T., BLACHÈRE T., GOCZA E., BERNAT A., YERLE M., ACLOQUE H., HIDOT S., BOSZE S., DURANTHON V., SAVATIER P., AND AFANASSIEFF M. 2013. Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naïve pluripotency. *Biology Open*, 2(6) :613-628.
- TAKAHASHI K., AND YAMANAKA S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4):663-676.
- 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.