



HAL
open science

Intérêt des cellules souches pluripotentes induites de lapin pour la conservation de cette espèce

Yann Tapponnier, Thierry Joly, Sophie Voisin, Nathalie Daniel, Véronique Duranthon, Marielle Afanassieff

► To cite this version:

Yann Tapponnier, Thierry Joly, Sophie Voisin, Nathalie Daniel, Véronique Duranthon, et al.. Intérêt des cellules souches pluripotentes induites de lapin pour la conservation de cette espèce. 16. Journées de la Recherche Cunicole, Institut Technique de l'Aviculture et des Elevages de Petits Animaux (ITAVI). FRA. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), FRA., Nov 2015, Le Mans, France. hal-02740397

HAL Id: hal-02740397

<https://hal.inrae.fr/hal-02740397>

Submitted on 2 Jun 2020

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.



16^e Journées de la Recherche Cunicole



24 et 25 novembre 2015

**Le Mans
Palais des Congrès Cénomane**

avec le concours de :



Les 16^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole
ont été organisées avec le soutien financier
des sociétés et organismes suivants :

TECHNA FRANCE
NUTRITION

GROUPE
TECHNA



INZO^o

Innovation en Nutrition et Zootechnie

TERRENA
LA NOUVELLE AGRICULTURE



L'expertise nous réunit, L'efficacité vous réussit



Mardi 24 Novembre 2015

8H00 : ACCUEIL DES PARTICIPANTS

9H00 : DISCOURS D'OUVERTURE

Anne RICHARD – ITAVI, Thierry GIDENNE – INRA et Dominique LE CREN – CLIPP

9H15 : PATHOLOGIE ET PREVENTION (1/2)

Président de séance : Didier MARLIER - Faculty of Veterinary Medicine University of Liège

SYNTHESE

LA COMMUNICATION : PIERRE ANGULAIRE DE LA STRATEGIE ET DES TACTIQUES EN BIOSECURITE

G-P. MARTINEAU et J-P. VAILLANCOURT

SYNTHESE

L'ENTEROPATHIE EPIZOOTIQUE DES LAPINS : PASSE, PRESENT ET FUTUR

D. MARLIER

Evaluation de l'immunité humorale consécutive à la vaccination avec Dervaximyo SG33 chez des lapines reproductrices vaccinées à différents stades du cycle productif

B. LE NORMAND, S. CHATELLIER, I. DEVAUD, A. DELVECCHIO, A. LAVAZZA, L. CAPUCCI

Le nouveau virus de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD) : situation du RHDV2 en Europe et étude de la sensibilité des lapins à ce virus

G. LE GALL-RECULE, J. LE PENDU, E. LEMAITRE, B. LE MOULLAC-VAIDYE, A. DECORS, V. BEAUTE, E. FAURE, S. MARCHANDEAU

Cartographie des cas de VHD à RHDV2 (virus variant 2010) à partir des virus isolés depuis 2010 de lapins domestiques en France métropolitaine, sur l'île de la Réunion et en Espagne à l'aide d'une technique de RT-PCR temps réel

S. BOUCHER, D. RUBEAUX, G. LE GALL-RECULE, A. RIGAUDEAU

10H30 : PAUSE CAFE

11H00 : PATHOLOGIE ET PREVENTION (2/2)

Président de séance : Didier MARLIER - Faculty of Veterinary Medicine University of Liège

Durée de protection conférée par un vaccin vis-à-vis des calicivirus classique et variant de la maladie hémorragique virale du lapin

H. MORIN, O. LE MINOR, F. BEILVERT, T. LE MOULLEC

Staphylococcus aureus chez le lapin de chair en France : étude sur 355 souches, virulence (méthode Hermans), antibiorésistance et SARM (Staphylococcus aureus résistant à la méticilline)

B. LE NORMAND, S. BOUCHER

Sensibilité de *Pasteurella multocida* et de *Staphylococcus aureus* isolés sur des lapins de chair (*Oryctolagus cuniculus*) à des solutions phyto-aromathérapiques à l'aide de la technique du Phytogramme®

S. BOUCHER, T. MAUVISSEAU

Vers une amélioration de la résistance du lapin à la pasteurellose

E. HELLOIN, I. LANTIER, C. SLUGOCKI, E. CHAMBELLON, H. LE ROUX, P. BERTHON, F. KEMPF, C. ROSSIGNOL, S. BOUCHER, B. LE NORMAND, H. MORIN, L.M. BAUMIER, F. COISNE, E. FOURNIER, M. GUNIA, C. MORENO, H. GARREAU, F. LANTIER

Premières données sur la cryptosporidiose chez l'espèce *Oryctolagus cuniculus domesticus* en Algérie

L. MEZALI, F. MEBKHOUT, D. SAIDJ, S. MERAH, H. RAZALI, B. LARBI, L. ABDESSALEM

Infestation naturelle par *Passalurus ambiguus* en élevage lapins de chair. Intérêt d'une nouvelle méthode de diagnostic coproscopique et importance du ciblage des animaux pour les prélèvements fécaux

B. LE NORMAND, S. CHATELLIER, P. MERCIER

12H20 : DEJEUNER

13H50 : GENETIQUE

Présidente de séance : Hélène GILBERT – INRA

SYNTHESE

GENETIQUE ET RESISTANCE AUX MALADIES

M. GUNIA

Utilisation de signes cliniques pour la sélection sur la résistance aux maladies : paramètres génétiques en lignées paternelles

M. GUNIA, I. DAVID, J. HURTAUD, M. MAUPIN, H. GILBERT, H. GARREAU

Paramètres génétiques des phénotypes liés aux maladies chez le lapin en engraissement nourri avec deux régimes alimentaires différents

M. RAGAB, J. RAMON, O. RAFEL, R. QUINTANILLA, M. PILES, J.P. SANCHEZ

Étude des effets de la lignée de l'animal et de celle de la mère adoptive sur sa croissance et son efficacité alimentaire selon le niveau de sélection pour la consommation résiduelle

J. RUESCHE, L. DROUILHET, H. GILBERT, E. BALMISSE, F. BENITEZ, F. RICHARD, I. DAVID, H. GARREAU, O. ZEMB

Relation entre les critères de sélection de la lignée INRA 1777 et la survie des lapereaux

H. GARREAU, E. BALMISSE, J. RUESCHE, J. HURTAUD, M. MAUPIN, L. CANARIO, I. DAVID

15H05 : REPRODUCTION

Présidente de séance : Michèle THEAU-CLEMENT – INRA

Le développement précoce des lapins sélectionnés sur la vitesse de croissance affecte-t-il la production spermatique ?

E. MARTÍNEZ-PAREDES, J. LLORENS, L. RÓDENAS, D. SAVIETTO, J.J. PASCUAL

La préparation des jeunes femelles futures reproductrices hybrides : effet de leur mode d'alimentation sur leurs performances de reproduction au cours des trois premiers cycles

J. DUPERRAY, E. GRAND, D. WEISSMAN, JM. LAURENT, C. LAUNAY

Effets de la taille de portée à la naissance et du nombre de lapereaux allaités sur les aptitudes laitières des lapines de deux génotypes

K. CHIBAH-AIT BOUZIAD, N. ZERROUKI-DAOUDI, F. LEBAS

Diagnostic de gestation : une nouvelle méthode non invasive permettant d'estimer le potentiel de prolificité pendant la gestation de la lapine

R. ROBERT, K. BEBIN, V. LOUSSOUARN, P. DOBE, D. GARDAN-SALMON, N. DESTOMBES, C. BRIENS

Intérêt des cellules souches pluripotentes induites de lapin pour la conservation de cette espèce

Y. TAPPONNIER, T. JOLY, S. VOISIN, N. DANIEL, V. DURANTHON, M. AFANASSIEFF

16H10 : PAUSE-CAFÉ

16H30 : SESSION ASFC - Les jeunes lapines : clés de succès de l'élevage

Présidente de séance : Chantal DAVOUST – ASFC

SYNTHESE

PREPARATION DES FUTURS REPRODUCTRICES ET REPRODUCTEURS

J.J. PASCUAL

18H30 : ASSEMBLEE GENERALE DE L'ASFC

19H00 : COCKTAIL

MERCREDI 25 novembre 2015

8H00 : ACCUEIL DES PARTICIPANTS

8H30 : ALIMENTATION (1/2)

Président de séance : Jean Marc SALAÛN – SANDERS

SYNTHESE

MAITRISE DE L'INGERE ALIMENTAIRE ET CONSEQUENCE SUR LA PHYSIOLOGIE DE L'ANIMAL

C. KNUDSEN

Effet de la cinétique de rationnement sur les performances de croissance et d'abattage de lapins de chair

E. GRAND, D. WEISSMAN, C. LAUNAY, E. PICARD, G. TROISLOUCHES, C. DAVOUST

Performances de croissance et santé des lapins lors d'une restriction alimentaire post sevrage par substitution de l'amidon par des fibres digestibles, dans un aliment énergétique

C. KNUDSEN, S. COMBES, C. BRIENS, J. DUPERRAY, G. REBOURS, J-M. SALAUN, A. TRAVEL, D. WEISSMAN, T. GIDENNE

Effet de la forme d'apport d'énergie sur les performances zootechniques des lapins en engraissement, et le coût alimentaire

M. BOUCHIER, G. REBOURS, P. VASTEL, S. REYS

Gérer l'ingestion d'énergie après le sevrage pour un compromis entre santé et performances chez le lapin en croissance

T. READ, S. COMBES, T. GIDENNE, N. DESTOMBES, L. GRENET, E. BALMISSE, P. AYMARD, D. LABATUT,

L. FORTUN-LAMOTHE

Impact de deux types de pulpes de raisin, différenciées par leur procédé de production, sur la digestion, les performances zootechniques et le stress oxydant de lapins en engraissement

D. COULMIER, B. RENOUF, S. REYS, C. BRIENS, P. DORCHIES, G. REBOURS

Digestibilité des fines de chènevotte et effets sur la croissance et la santé du lapin en croissance

P. DORCHIES, J-M. SALAÛN, A. BOURDILLON, A. PICOT

Effet de l'incorporation des marcs de myrtilles sur les paramètres de croissance et la digestibilité des lapins à l'engraissement

S. DABBOU

10H25 : PAUSE-CAFE

10H55 : ALIMENTATION (2/2)

Président de séance : Jean Marc SALAÛN – SANDERS

Variabilité des profils d'ingestion de lait des lapereaux et conséquences sur leurs performances

A. ARNAU-BONACHERA, E. BLAS, C. CERVERA, E. MARTINEZ-PAREDES, L. RODENAS, J.J. PASCUAL

Réponses à la sélection pour deux critères d'efficacité alimentaire chez le lapin. 1. Croissance, ingéré et efficacité alimentaire

H. GARREAU, H. GILBERT, C. MOLETTE, C. LARZUL, E. BALMISSE, J. RUESCHE, A. SECULA-TIRCAZES, T. GIDENNE,

L. DROUILHET

Réponses à la sélection pour deux critères d'efficacité alimentaire chez le lapin. 3. Analyse de la digestion et des rejets

T. GIDENNE, H. GARREAU, C. MOLETTE, L. DROUILHET, H. GILBERT, C. LARZUL, BALMISSE E., M. SEGURA, J. RUESCHE,

M.L. CHEMIT, A. SECULA-TIRCAZES, C. BANNELIER, L. FORTUN-LAMOTHE

11H35 : QUALITE DE LA VIANDE

Président de séance : Gwenaël REBOURS – TECHNA

Réponses à la sélection pour deux critères d'efficacité alimentaire chez le lapin. 2. Caractères de carcasse et de qualité de viande

H. GARREAU, C. MOLETTE, H. GILBERT, C. LARZUL, E. BALMISSE, J. RUESCHE, A. SECULA-TIRCAZES, T. GIDENNE,

L. DROUILHET

Croissance et qualité des carcasses et de la viande de lapins de trois génotypes croisés, nourris avec 2 types d'aliment et abattus à poids vif fixe

F. LEBAS

Intérêt de l'évaluation par échographie des caractéristiques de carcasse pour la sélection du lapin de chair

G. LENOIR, F. MORIEN

Relations entre des critères mesurés par tomographie et les caractéristiques des carcasses chez le lapin

I. NAGY, T. DONKO, B. CZAKO, I. RADNAI, T. NEMETH, ZS. MATICS, ZS. GERENCSÉR, ZS. SZENDRŐ

Utilisation de la technique d'impédance bioélectrique (IBE) pour déterminer la composition corporelle des lapins en croissance

A. SAIZ, A.I. GARCIA-RUIZ, S. CHAMORRO, C. ALFONSO, N. NICODEMUS

Influence des pratiques d'élevage sur le taux de saisie des lots de lapins en abattoir

L. FOUCHÉZ, A. TESSERAU, B. GREFFARD, A. BRUHIER

12H50 : DEJEUNER

14H20 : SYSTEMES D'ELEVAGE, ECONOMIE, ENVIRONNEMENT

Présidente de séance : Sylvie COMBES – INRA

Résultats technico-économiques des éleveurs de lapins de chair en France en 2014

G. COULETEL

Etat des lieux de l'antibiorésistance en élevage cynicole français et application du concept d'exclusion compétitive pour limiter la transmission d'un microbiote maternel antibiotique

C. ACHARD, V. DUPOUY, S. SIVIGLIA, N. ARPAILLANGE, B. GABINAUD, S. COMBES, Y. RAMAYO-CALDAS, C. DENIS, M. BALLESTER, S. BOUCHER, B. DILE, S. CHATELLIER, B. LE NORMAND, A. CHAUBET, D. ESQUERRE, A. GHOZLANE, E. RUPPE, A. BOUSQUET-MELOU, J. ESTELLE, O. ZEMB

Intérêt et limites de l'ajout de fèces dures dans le nid sur la santé des lapereaux

D. SAVIETTO, A.Y. PRIGENT, T. GIDENNE, M. COLIN, S. COMBES, O. ZEMB, L. FORTUN-LAMOTHE

Éléments de diagnostic des conditions de travail en élevage cynicole. Etude exploratoire

B. PICHARD, C. MAILLOUX, E. ORHANT, S. GUILLO, A. LOZAHIC, N. JAGUT, F. DASSE

Les facteurs de variation de la pénibilité du travail en élevage cynicole

L. FOUCHÉZ, A. TESSERAU, B. GREFFARD, A. BRUHIER

L'impact d'un logement temporairement en groupe et du sol sur le bien-être des lapines

L. MAERTENS, S. BUIJS, F.A.M. TUYTTENS

15H35 : PHYSIOLOGIE

Présidente de séance : Laurence LAMOTHE – INRA

Caractérisation de la fraction protéique du lait produit par deux types génétiques de lapine de la région de Tizi Ouzou

T. AMROUN, L. BIANCHI, N. ZERROUKI-DAOUDI, G. BOLET, F. LEBAS, M. CHARLIER, E. DEVINOY, P. MARTIN, G. MIRANDA

Modulation de la composition l'écosystème digestif caecal du lapereau par voie alimentaire et relation avec son fonctionnement

V. JACQUIER, S. COMBES, G. PASCAL, L. CAUQUIL, B. GABINAUD, M. SEGURA, O. BOUCHEZ, E. BALMISSE, S. LU, J. ESTELLE, I. OSWALD, C. ROGEL-GAILLARD, T. GIDENNE

Effets de la teneur en énergie et en protéines de l'aliment sur la composition du microbiote caecal chez le lapereau

T. READ, L. FORTUN-LAMOTHE, T. GIDENNE, N. DESTOMBES, L. GRENET, E. BALMISSE, P. AYMARD, D. LABATUT, S. COMBES

La corticostéronémie chez la lapine : étude descriptive chez des nullipares, primipares et multipares

B. LE NORMAND, S. CHATELLIER, C. VIGUIE, I. DEVAUD

16H30 : DISCOURS DE CLOTURE

Guy AIRIAU - CLIPP

16èmes Journées de la Recherche Cunicole

COMITE D'ORGANISATION

- Marie BOURIN - ITAVI
- Guillaume COULETEL - ITAVI
- Chantal DAVOUST - ASFC
- Valérie FLEURY - ITAVI
- Laurence FORTUN-LAMOTHE - INRA
- Thierry GIDENNE - INRA
- Michèle THEAU-CLEMENT - INRA
- Angélique TRAVEL - ITAVI

COMITE SCIENTIFIQUE

- Stéphane BERTAGNOLI - ENVT
- Marie BOURIN - ITAVI
- Sylvie COMBES - INRA
- Gérard COUREAUD - INRA
- Guillaume COULETEL - ITAVI
- Chantal DAVOUST - ASFC
- Laurence FORTUN-LAMOTHE - INRA
- Hervé GARREAU - INRA
- Thierry GIDENNE - INRA
- Michèle THEAU-CLEMENT - INRA
- Angélique TRAVEL - ITAVI

avec le partenariat privilégié de :

GROUPE
TECHNA

 **SANDERS**
Nourrir nous engage

INZO

Innovation en Nutrition et ZOotechnie

Intérêt des cellules souches pluripotentes induites de lapin pour la conservation de cette espèce

Y. TAPPONNIER¹, T. JOLY², S. VOISIN¹, N. DANIEL³, V. DURANTHON³,
M. AFANASSIEFF¹

¹Institut Cellule Souche et Cerveau, INSERM U846, INRA USC1361, 69500 Bron, France

²ISARA-Lyon, VetAgroSup, UPSP ICE, 69280 Marcy l'Etoile, France

³INRA, Biologie du Développement et de la Reproduction, 78352 Jouy-en-Josas, France

Résumé - Pour maintenir la biodiversité d'une espèce donnée, il est essentiel de développer les techniques de cryoconservation permettant de conserver à long terme les ressources génétiques de cette espèce. Pour cela, on peut conserver des embryons, des gamètes mâles ou femelles, ou encore des tissus somatiques. Les techniques de prélèvement et de cryoconservation des embryons et du sperme sont efficaces et couramment utilisées chez le lapin, mais elles ne sont pas applicables à tous les individus. Afin d'élargir le nombre d'échantillons conservés, il est donc souhaitable de pouvoir congeler des tissus somatiques qui peuvent être facilement prélevés sur le terrain sans préparation préalable de l'animal. Les cellules somatiques ainsi conservées pourront ensuite être reprogrammées en cellules souches pluripotentes induites (ou iPSC), afin de produire des animaux chimères. Nous ferons le point sur l'état des recherches actuelles sur les iPSC de lapin et leur intérêt pour la conservation de cette espèce.

Abstract – Interest of rabbit induced pluripotent stem cells for species preservation – Developing cryobanking techniques is essential to maintain the biodiversity of a given species and the long-term preservation of its genetic resources. For that purpose, we can preserve embryos, male or female gametes, or somatic tissues. Sampling and cryogenic preservation of embryos and sperm are effective and commonly used in rabbits, but they are not applicable to all animals. Consequently, to widen the number of preserved samples, it is necessary to freeze somatic tissues such as fragments of skin or blood cells. These somatic cells could afterward be reprogrammed in pluripotent stem cells (or iPSCs) in order to produce animal chimera. This paper will review the current state of rabbit iPSC researches and their interest for species preservation.

Introduction

Environ un tiers des souches domestiques est considéré comme étant à risque d'extinction selon l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO, 2007). Cette perte de biodiversité est due à l'augmentation de la sélection animale et a conduit à la création dès 1999 de la Cryobanque Nationale, dont le but est la conservation des cellules reproductives de toutes les espèces domestiques utilisées pour l'alimentation. Les ressources génétiques animales de la Cryobanque Nationale sont une base importante des sélections actuelles et de l'amélioration des espèces domestiques. Elles permettent également le développement de nombreux projets de recherche visant à caractériser la diversité génomique et à établir les relations existantes entre génotypes et phénotypes. Pour renforcer l'action de la Cryobanque Nationale, une Infrastructure Nationale en Biologie et Santé a été créée en 2012, afin de regrouper en réseau les différents Centres de Ressources Biologiques (CRB) pour les animaux domestiques. Cette infrastructure appelée CRB-Anim, pilotée par l'INRA et dirigée par Michèle Tixier-Boichard, vise à préserver la biodiversité de différents mammifères, oiseaux et poissons, élevés pour l'industrie alimentaire. Elle a un quadruple but : (i) coupler les CRB reproductifs et génétiques pour étudier les relations entre génotypes

et phénotypes ; (ii) développer de nouvelles procédures de cryoconservation ; (iii) définir des méthodes d'échantillonnage garantissant leur sécurité sanitaire ; et (iv) augmenter les collections des CRB. Dans ce cadre, la Cryobanque Nationale Lapin va augmenter ses collections avec 4 grands types d'animaux : (i) les races à petits effectifs choisis par la Fédération Française de Cuniculture ; (ii) les races à intérêt particulier comme le lapin Bélier et les lapins phanères sélectionnés ; (iii) les populations commerciales de lapin de chair ; et (iv) les populations transgéniques ou à intérêt scientifique sélectionnées par l'INRA. De plus, toujours dans le cadre de CRB-Anim, 4 axes de recherche sont développés afin d'améliorer et d'augmenter les échantillons congelés : (i) le remplacement des produits animaux dans les dilueurs de cryoconservation ; (ii) la cryoconservation de cortex ovarien de lapine ; (iii) la préservation et l'utilisation de tissus somatiques ; et (iv) l'amélioration du clonage somatique. Le travail présenté ici concerne ces deux derniers axes de recherche.

1. Les cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont obtenues par reprogrammation génétique de cellules somatiques adultes, telles que des fibroblastes de peau, grâce à la surexpression de gènes spécifiques apportés dans les cellules par des vecteurs dérivés de virus (Takahashi and Yamanaka, 2006). Les cellules

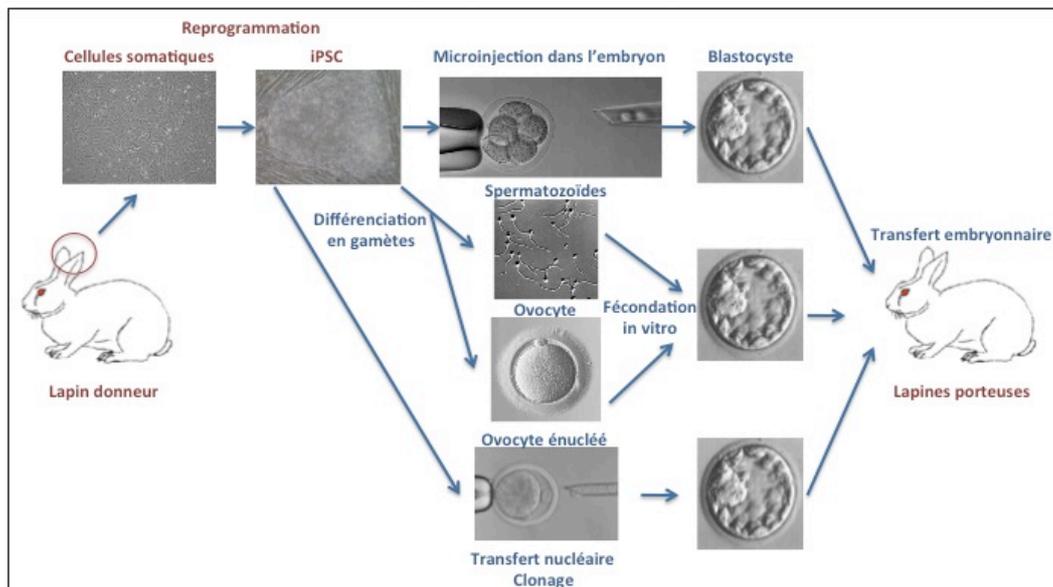
résultantes présentent les mêmes propriétés que les cellules souches embryonnaires (ESC) qui sont issues de la masse cellulaire interne (ICM) d'embryons au stade blastocyste (Evans and Kaufman, 1981), notamment l'autorenouvellement (c'est-à-dire la capacité de se multiplier indéfiniment et à l'identique en culture) et la pluripotence (à savoir la capacité à se différencier dans tous les tissus qui composent un organisme adulte, y compris la lignée germinale). Cette technique de reprogrammation cellulaire qui modifie génétiquement les cellules pour les ramener à un état embryonnaire, 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'iPSC 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 4 gènes (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* et *cMyc*) (Afanassieff *et al.* 2014). La reprogrammation se produit très lentement et aléatoirement dans quelques cellules qui expriment de façon adéquate les transgènes apportés par les virus. L'efficacité de reprogrammation est très faible, mais les quelques cellules qui perdent leurs propriétés de cellules de foie, d'intestin ou de peau, sont à l'origine de lignées d'iPSC qui présentent des propriétés équivalentes à celles des lignées d'ESC de lapin.

2. Les iPSC et la conservation des espèces

Chez la souris, les iPSC, comme les ESC, sont capables de coloniser un embryon hôte et de participer

au développement de tous les tissus, y compris la lignée germinale (Bradley *et al.* 1984). Les souris chimères obtenues peuvent donc transmettre à leur descendance le patrimoine génétique des cellules somatiques d'origine. De plus, il est possible de différencier en culture les iPSC en gamètes mâles (Henh *et al.* 2013) ou femelles (Hayashi and Saitou, 2013) fonctionnelles, qui peuvent à leur tour être utilisées pour produire un embryon par fécondation *in vitro*. Enfin, les iPSC peuvent servir de cellules donneuses de noyaux pour le clonage par transfert nucléaire (Wilmot *et al.* 1997), et permettre la production d'animaux clonés porteurs du génome des cellules somatiques d'origine. Ainsi la reprogrammation cellulaire et l'obtention d'iPSC ouvrent de nouvelles perspectives pour la conservation des espèces. Il est possible de congeler des tissus somatiques, des cellules issues de ces tissus somatiques, ou encore des iPSC résultant de la reprogrammation de ces cellules somatiques (Figure 1). Selon la qualité des iPSC obtenues, elles pourront être utilisées par la suite pour transmettre le patrimoine génétique du lapin donneur selon trois techniques : (i) par microinjection dans un embryon receveur pour obtenir un lapin chimère capable de transmettre à sa descendance le génome des cellules injectées ; (ii) par différenciation en cellules reproductrices, spermatozoïdes et/ou ovocytes ; et (iii) par transfert nucléaire dans un ovocyte receveur énucléé pour produire un lapin cloné porteur du même patrimoine génétique que les cellules d'origine.

Figure 1 : Intérêt des cellules souches pluripotentes induites pour la conservation de l'espèce lapin.



3. Etat des recherches sur l'utilisation des iPSC pour la conservation de l'espèce lapin

3.1. Choix du tissu somatique à congeler

Différents critères sont pris en considération pour définir le choix du tissu à entrer en cryobanque : (i) la

facilité de prélèvement quelles que soient les conditions de terrain ; (ii) la possibilité de maintenir les échantillons à 4°C plusieurs jours avant leur traitement ; (iii) la simplicité de préparation de l'échantillon avant congélation ; (iv) la qualité des cellules somatiques obtenues après décongélation ; et

(v) l'aptitude des cellules à être reprogrammées en iPSC. Les deux premiers critères restreignent le choix aux biopsies de peau et aux prélèvements de sang circulant. Le troisième critère n'est applicable qu'aux biopsies de peau car seules les cellules sanguines mononucléaires peuvent être reprogrammées et doivent donc être isolées du reste du prélèvement avant leur congélation. Enfin les deux derniers critères sont connus et applicables aux fibroblastes de peau chez le lapin, mais restent à définir pour les cellules mononucléaires sanguines, bien que ces dernières soient couramment utilisées pour la production d'iPSC humaines. De ce fait, les premières études entreprises dans le cadre de CRB-Anim ont visé à définir les conditions de préparation et de congélation des biopsies de peau d'oreille de lapin et à établir la qualité des fibroblastes obtenus à partir de ces tissus congelés. Pour cela, la partie cartilagineuse et la peau du côté imberbe des biopsies ont été congelées immédiatement après le prélèvement ou après un maintien à 4°C pendant 48h dans un tampon isotonique (PBS), en présence de 4 ou 10% de cryoprotecteur (DMSO), dans du sérum ou dans un milieu synthétique appelé Stem alpha (Bruyère *et al.* 2013), en fragments entiers de 1 cm² ou découpées en petits morceaux de 1 mm², et en conditions contrôlées avec une descente en température de 1°C/min. Les résultats montrent que quelles que soient les conditions de congélation utilisées, il est toujours possible de dériver des fibroblastes à partir de ces biopsies d'oreille. Seules, la morphologie des cellules varie et la vitesse de dérivation des fibroblastes augmente par rapport à des échantillons non congelés.

3.2. Choix de la technique de reprogrammation

Les iPSC de lapin publiées jusqu'à présent ont été obtenues à l'aide de vecteurs rétroviraux capables d'exprimer les transgènes nécessaires à la reprogrammation. Cependant, l'utilisation de ce type de vecteur implique une modification génétique des cellules, car ces vecteurs ont la propriété de s'intégrer dans le génome des cellules du fait de leur origine rétrovirale. Une modification génétique des cellules utilisées pour la conservation du patrimoine génétique d'un animal étant inacceptable, il faut donc utiliser des techniques de reprogrammation employant des systèmes dits non intégratifs, c'est-à-dire qui ne modifient pas le génome des cellules reprogrammées. De tels systèmes, comme la transfection d'ARNm ou l'emploi de virus non intégratifs de type Sendai, ont été mis au point chez la souris et sont couramment utilisés chez l'Homme. Ils devront être testés chez le lapin afin de définir la méthode la plus efficace et la plus sûre pour obtenir des iPSC identiques génétiquement aux cellules somatiques d'origine.

3.3. Amélioration de l'efficacité de colonisation embryonnaire des iPSC

Les iPSC de souris, comme les ESC murines colonisent très efficacement un embryon receveur et

sont habituellement utilisées pour produire des lignées de souris transgéniques porteuses de mutations génétiques ciblées. Cependant chez le lapin, comme chez les autres mammifères étudiés, aucune lignée d'iPSC n'a pu jusqu'à présent coloniser un embryon receveur de façon suffisamment importante pour produire une chimère somatique et germinale (Osteil *et al.* 2013), étape indispensable à l'utilisation des iPSC pour la conservation des espèces. Il apparaît que cette différence de capacité entre les cellules de rongeur et celles des autres mammifères soit due à des variations dans les mécanismes moléculaires qui maintiennent le caractère pluripotent des iPSC (Nichols and Smith, 2009). Les recherches actuelles visent donc à modifier ces mécanismes employés par les iPSC de lapin afin de les forcer à utiliser les processus moléculaires fonctionnels dans les iPSC de rongeur. Plusieurs modifications possibles ont déjà été testées dans les iPSC humaines et semblent prometteuses (Chen *et al.* 2015 ; Takashima *et al.* 2014). Les premiers essais réalisés sur des iPSC de lapin ont permis d'améliorer notablement leur taux de colonisation embryonnaire (Figure 2), bien que ces derniers restent encore insuffisants pour assurer un chimérisme germinal et une utilisation en routine dans le cadre de la conservation des espèces. L'étude moléculaire approfondie des premiers stades embryonnaires devrait permettre de développer des approches plus ciblées et mieux adaptées aux cellules de lapin afin d'atteindre un taux de chimérisme somatique et germinal important.

3.4 Amélioration du clonage somatique

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, très coûteuse et a un taux de réussite très faible. Dans cette espèce, le clonage somatique ne donne régulièrement naissance à des individus viables qu'après utilisation de cellules donneuses de noyaux non cultivées (typiquement des cellules du cumulus). Cependant des études réalisées chez la souris montrent que l'efficacité du clonage augmente si les cellules donneuses sont pluripotentes. L'objectif du travail réalisé dans le cadre de CRB-Anim est donc de tester l'efficacité du clonage de cellules souches pluripotentes de lapin, iPSC et ESC, maintenues préalablement en culture et congelées.

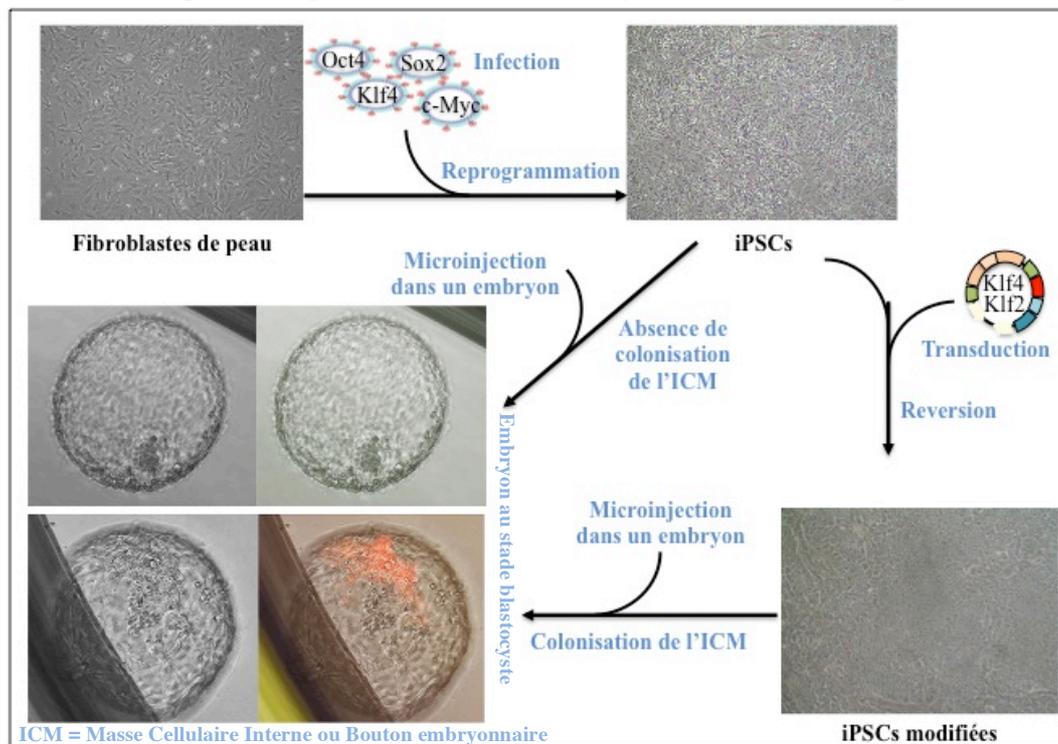
Conclusion

Les iPSC sont des outils biotechnologiques très performants utilisables pour la conservation du patrimoine génétique aussi bien mâle que femelle. Les lignées d'iPSC de lapin publiées jusqu'à présent n'ont pas encore les propriétés suffisantes pour être employées dans le cadre de la conservation de cette espèce. Les recherches développées au sein de l'infrastructure CRB-Anim visent donc : (i) à comprendre les mécanismes moléculaires en jeu dans la capacité de colonisation embryonnaire de ces

cellules ; (ii) à définir les conditions de cryo-conservation des cellules somatiques à reprogrammer en iPSC ; et (iii) à établir les conditions de

reprogrammation nécessaires à l'utilisation de ces cellules pour la préservation du patrimoine génétique de l'espèce lapin.

Figure 2 : Capacité de colonisation embryonnaire des iPSC de lapin



Remerciements

Yann Taponnier a bénéficié d'une bourse de thèse de la Région Rhône-Alpes (ADR CIBLE 2010). Ces recherches sont financées par les Infrastructures Nationales en Biologie et Santé INGESTEM (ANR-11-INBS-0009) et CRB-Anim (ANR-11-INBS-0003).

Références

AFANASSIEFF M., TAPPONNIER Y., AND SAVATIER P. 2014. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits. *Methods in Molecular Biology*, DOI 10.1007/7651_2014_140.

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.

BRUYERE P., BAUDOT A., JOLY T., COMMIN L., PILLET E., GUERIN P., LOUIS G., JOSSE-SCHRAMME A., AND BUFF S. 2013. A chemically defined medium for rabbit embryo cryopreservation. *Plos One*, 8(8) :e75154.

CHEN H., AKSOY I., GONNOT F., OSTEIL P., AUBRY M. HAMELA C., ROGNARD C., HOCHARD A., VOISIN S., FONTAINE E., MURE M., AFANASSIEFF M., CLEROUX E., GUIBERT S., CHEN J., VALLOT C., ACLOQUE H., GENTHON C., PAIN B., BOURILLOT P.Y., AND SAVATIER P. 2015. Reinforcement of stat3 activity reprogrammes human embryonic stem cells to naive-like pluripotency. *Nature Communications*, DOI : 10.1038/ncomms8095.

CHESNE 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.

EVANS M.J., AND KAUFMAN M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.

FAO. 2007. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture.

HAYASHI K., AND SAITOU M. 2013. Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 8(8) :1513-1524.

HENH C., XIAOYU X., LI W., YUE L., ZUPING H., QIANGSU G., AND CHEN X. 2013. In vitro and in vivo differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 433 :286-291.

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.

NICHOLS J., AND SMITH A. 2009. Naive and primed pluripotent states. *Cell stem cell*, 4(6) :487-492.

OSTEIL P., TAPPONNIER Y., MARKOSSIAN S., GODET M., SCHMALTZ-PANNEAU B., JOUANEU 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 naive 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.

TAKASHIMA Y., GUO G., LOOS R., NICHOLS J., FICZ G., KRUEGER F., OXLEY D., SANTOS F., CLARKE J., MANSFIELD W., REIK W., BERTONE P., AND SMITH A. 2014. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell*, 157:1254-1269.

WILMUT I., SCHNIEKE A.E., MCWHIR L., KIND A.J., AND CAMPBELL K.H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619):810-813.