



HAL
open science

Les cellules souches embryonnaires de lapin : Etat des lieux et perspectives

Pierre Osteil, Marielle Afanassieff, Thierry Joly

► To cite this version:

Pierre Osteil, Marielle Afanassieff, Thierry Joly. Les cellules souches embryonnaires de lapin : Etat des lieux et perspectives. 15. Journées de la Recherche Cunicole, Institut Technique de l'Aviculture et des Elevages de Petits Animaux (ITAVI). FRA., Nov 2013, Le mans, France. hal-02746519

HAL Id: hal-02746519

<https://hal.inrae.fr/hal-02746519v1>

Submitted on 3 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.



15èmes journées de la Recherche Cunicole

Le Mans, 19 et 20 novembre 2013
Palais des Congrès et de la Culture

PROGRAMME

Deux jours d'informations et de discussions sur les développements scientifiques et techniques dans
le secteur du lapin

Mardi 19 Novembre 2013

8 H 30

ACCUEIL DES PARTICIPANTS

9 h 00

OUVERTURE

Bernard COUDURIER – Chargé de mission DS Agriculture de l'INRA

Anne RICHARD – Directrice de l'ITAVI

Chantal DAVOUST – ASFC

9 h 15

ALIMENTATION ET TECHNIQUE D'ELEVAGE

Présidents de séance : **Thierry GIDENNE** – INRA et **Joël DUPERRAY** (INVIVO N.S.A)

Synthèse : L'efficacité alimentaire en cuniculture: impacts technico-économiques et environnementaux **Gidenne Thierry, Aubert Claude, Drouilhet Laurence, Garreau Hervé**

Estimation des paramètres génétiques de croissance et d'efficacité alimentaire dans deux lignées commerciales. **Garreau Hervé, Hurtaud Jacques, Drouilhet Laurence**

Interaction entre le génotype et le régime alimentaire pour le poids après-sevrage des lapins nourris ad libitum ou restreints. **Piles Rovira Miriam, Ramon Riba Josep, Rafel Guarro Oriol, Sánchez J.P.**

Influence du rythme de reproduction et de l'âge au sevrage sur la productivité des lapines et des lapereaux. **Ramon Riba Josep, Rafel Guarro Oriol, Piles Rovira Miriam**

10 h30

PAUSE CAFÉ

11 h 00

ALIMENTATION ET TECHNIQUE D'ELEVAGE

Estimation de la digestibilité des protéines et de la teneur en énergie digestible des matières premières pour le lapin, avec un système d'équations. **Lebas François**

Impact de la date de transition entre l'aliment maternité et l'aliment péri-sevrage : un levier d'action pour améliorer l'état corporel des lapines. **Weissman Delphine, Launay Claire, Davoust Chantal**

Performances de femelles logées temporairement en groupe dans des parcs polyvalents et en système tout plein tout vide. **Maertens Luc, Buijs Stephanie**

Contribution à la recherche des conditions optimales pour élever des lapins en parcs hors sol : Résultats d'un centre de référence et d'expérimentation en Belgique en conditions de production **Jacquet Michel, Bauwens Véronique, Teller Christian, Dewasmes Véronique, Maertens Luc, Marlier Didier**

Intérêt d'une mise à jeun quotidienne pour améliorer les performances des lapins en engraissement. **Duperray Joël, Guyonvarch Alain**

Ingestion restreinte et concentration énergétique de l'aliment : Impact sur la santé, les performances et le rendement à l'abattage du lapin. **Knudsen Christelle, Combes Sylvie, Briens Christophe, Duperray Joël, Rebours Gwenaël, Salaün Jean-Marc, Travel Angélique, Weissman Delphine, Gidenne Thierry**

Comportement individuel de lapins en croissance, logés en cages collectives et rationnés. Premiers résultats. **Le Normand Bernadette, Chatellier Stéphane, Couteau Mathieu**

Incorporation de fibres rapidement fermentescibles dans un aliment périsévragé : impact sur la digestion, la croissance et l'état sanitaire du lapin. **Jacquier Vincent, Combes Sylvie, Oswald Isabelle, Rogel-Gaillard Claire, Gidenne Thierry**

Incidence de deux solutions à base de composants d'huiles essentielles sur les performances de croissance, la flore et la qualité des viandes de lapin en engraissement. **Giannenas Ilias, Kontopidis George, Triantafyllou Evangelos, Chronis Ef, Wiemann Matthias, Gigaud Verane**

12 h 30

DEJEUNER

14 h 00

LAPEREAUX AU NID

Présidente de séance : Bernadette LE NORMAND (CLIN VET des MARCHES de BRETAGNE)

Synthèses : Lapereaux de la naissance au sevrage : quels outils pour des lapereaux plus robustes ?
Combes Sylvie, Gidenne Thierry, Boucher Samuel, Fortun-Lamothe Laurence, Bolet Gérard, Coureaud Gérard

Comportement d'ingestion de fèces dures maternelles par les lapereaux au nid.

1. quantification de la production maternelle de fèces et de leur ingestion par les lapereaux au nid.
Gidenne Thierry, Combes Sylvie, Fidler Claire, Fortun-Lamothe Laurence

Comportement d'ingestion de fèces dures maternelles par les lapereaux au nid. 2. influence sur l'implantation du microbiote caecal et sur la survie des lapereaux. **Combes Sylvie, Gidenne Thierry, Cauquil Laurent, Balmissé Elodie, Aymard Patrick, Bonnemere Jean-Marie, Bannelier Carole, Gabinaud Béatrice, Segura Muriel, Tartie Véronique, Fortun-Lamothe Laurence**

Paramètres génétiques du poids du lapereau à la naissance dans une lignée sélectionnée sur les performances de reproduction. **Loussouarn Vincent, Robert Raphaël, Garreau Hervé**

Capacité d'ingestion d'aliment sec par le lapereau au nid : interaction avec l'ingestion de fèces dures maternelles. **Gidenne Thierry, Combes Sylvie, Fortun-Lamothe Laurence, Zemb Olivier**

Effets de différentes techniques d'allaitement chez les lapines multipares sur la viabilité et la croissance des lapereaux au nid. **Dorchies Paul, Salaün Jean-Marc, Bourdillon Anne, Picot Anne**

Impact du nombre de lapereaux laissés au nid sur la carrière des femelles et les performances des jeunes. **Bignon Laure, Bourin Marie, Galliot Pascal, Souchet Christophe, Travel Angélique**

15 h 40

ECONOMIE ET PROSPECTIVES

Présidente de séance : Dominique LE CREN – CLIPP

Synthèse : Menaces et opportunités pour la consommation de viande de lapin (Cécile GUILLOT)

Résultats technico-économiques des éleveurs de lapins de chair en France en 2012. **Coutelet Guillaume**

16 h30

PAUSE CAFÉ

17 h 00

SESSION ASFC **Médication raisonnée : Comment poursuivre nos progrès?**

Présidente de séance : Chantal DAVOUST - ASFC

Synthèse : Facteurs humains et usages des antibiotiques en filière cunicole : Étude de quelques déterminants psychologiques. **Le Bouquin Sophie, Rouxel Geraldine, Mihoc Ecatarina, Chauveau Virginie, Terrade Florence, Chauvin Claire**

18 h 30

Assemblée générale de l'ASFC

19 h 00

Cocktail

Mercredi 20 Novembre 2013

8 h 15

ACCUEIL DES PARTICIPANTS

8 h 45

SYSTEME D'ELEVAGE ET DURABILITE

Présidente de séance : Isabelle BOUVAREL – ITAVI

Synthèse : Agro-écologie et écologie industrielle : deux voies complémentaires pour les systèmes d'élevage de demain. Applications potentielles aux systèmes cuniques. **Fortun-Lamothe Laurence, Thomas Marielle, Tichit Muriel, Jouven Magali, Gonzalez-Garcia Eliel, Dourmad Jean-Yves, Dumont Bertrand**

Estimation des flux d'éléments à risque pour l'environnement dans un élevage cunicole : une approche par modélisation **Meda Bertrand, Hassouna Mélynda, Fortun-Lamothe Laurence**

Simulations techniques et économiques autour de stratégies de conduites d'élevages cuniques. **Rebours Gwenaël, Vastel Pamela, Bouchier Marjorie**

Conséquences d'une restriction alimentaire chez le lapereau sevré sur les impacts environnementaux de la production de viande de lapin. **Zened Asma, Meda Bertrand, Ponchant Paul, Wilfart Aurélie, Arroyo Julien, Gidenne Thierry, Combes Sylvie, Fortun-Lamothe Laurence**

09h50

PAUSE CAFÉ

10 h 15

REPRODUCTION

Présidents de séance : Michèle THEAU-CLEMENT – INRA

Synthèse : L'allocation des ressources chez la lapine reproductrice : des stratégies génétiques pour une performance optimale. **Pascual Juan José, Cervera Concha, Saviato Davi, Baselga Manuel**

Evolution de la réceptivité sexuelle au cours d'une période d'allaitement de 41 jours chez la lapine primipare non-gestante **Ilès Imène, Belabbas Rafik, Boulbina Ibtissem, Zénia Safia, Ain Baziz Hacina**

Etude comparative des structures ovariennes des lapines en fonction de leur réceptivité au moment de l'accouplement et du stade *post coitum*. **Boumahdi-Merad Zoubida, Theau-Clement Michèle, Barbar Ali, Kaidi Rachid**

Etude de quelques facteurs de variation du taux de progestérone chez la lapine à 12-14 jours de gestation : le phénotype, la saison et la taille de portée. **Mazouzi-Hadid Fatima, Berchiche Mokrane, Zerrouki Nacera, Theau-Clément Michèle**

Utilisation de la péforéline dans la préparation des lapines reproductrices (*Oryctolagus Cuniculus*) à l'insémination artificielle. **Boucher Samuel, Hurtaud Jacques, Morel-Saives Annick, Merand Rodolphe**

Étude descriptive des causes de réforme des femelles reproductrices en élevage cunicole. **Lopez Sébastien, Chrétien Lucie, Salaün Jean-Marc, Wacquez Pierre Arnaud**

Etude descriptive des mortalités des femelles reproductrices en élevage cunicole. **Lopez Sébastien, Chrétien Lucie, Salaün Jean-Marc, Wacquez Pierre Arnaud**

Intérêt de l'utilisation de paracétamol autour de la mise bas chez la lapine reproductrice. **Lopez Sébastien, Chrétien Lucie, Dorchies Paul, Capdevielle Nathalie**

Caractéristiques des cornes utérines et des foetus dans deux lignées divergentes sélectionnées sur l'homogénéité du poids des lapereaux à la naissance. **Bolet Gérard, Theau-Clement Michèle, Pautot Corinne, Tircazes-Segula Aurélie, Bonnemère Jean-Marie, Labatut David, Auvergne Alain**

Héritabilité de la fécondance de la semence de lapin utilisée en insémination artificielle. **Brun Jean-Michel, Ailloud Elliot, Balmisse Elodie, Sanchez Amélie, Bolet Gérard, Theau-Clement Michèle**

12 h 30

DEJEUNER

14 h 00

REPRODUCTION (SUITE)

Présidents de séance : Gérard BOLET – INRA

Un traitement de superovulation des lapines nullipares améliore-t-il la production d'embryons ?
Theau-Clement Michèle, Tircazes-Secula Aurélie, Balmisse Elodie, Joly Thierry

Une désynchronisation des lapines receveuses améliore-t-elle les résultats de transfert d'embryons ?
Theau-Clement Michèle, Tircazes-Secula Aurélie, Balmisse Elodie, Joly Thierry

Les cellules souches embryonnaires de lapin : État des lieux et perspectives. **Osteil Pierre, Joly Thierry, Afanassieff Marielle**

Estimation des effets de dominance sur les composantes de la taille de portée dans une souche de lapin. **Nagy István, Curik Ino, Gorjanc Gregor, Farkas János, Németh Tímea, Szendrő Zsolt**

Analyse de la longévité des lapines d'une lignée commerciale. **Lenoir Guillaume, Maupin Mickaël, Leloire Claire, Garreau Hervé**

15 h 00

PATHOLOGIE ET PREVENTION

Président de séance : Dominique LICOIS – INRA

Sélection divergente pour les troubles digestifs dans deux lignées commerciales: Réponse de lapins 'sensibles' ou 'résistants' à une inoculation expérimentale de Escherichia Coli 0103. **Garreau Hervé, Brard Sophie, Hurtaud Jacques, Guïtton Edouard, Cauquil Laurent, Licois Dominique, Schwartz Bertrand, Balmisse Elodie, Tircazes-Secula Aurélie, Combes Sylvie, Gidenne Thierry**

Etude cinétique de l'excrétion oocystale chez la lapine et sa descendance et identification des différentes espèces de coccidies. **Henneb Mina, Aissi Meriem.**

Etude quantitative et qualitative des excréments oocystales d'Eimeria dans un élevage de lapins utilisant différentes stratégies de prévention contre les coccidies. Relations avec les performances zootechniques. **Colin Michel, Licois Dominique, Prigent Anne Yvonne**

Réponse du microbiote commensal de lapins EOPS à une reproduction expérimentale de l'EEL par l'inoculum TEC4 : résultats préliminaires de pyroséquençage 454. **Combes Sylvie, Licois Dominique, Cauquil Laurent, El Abed Nourhan, Fortun-Lamothe Laurence, Gidenne Thierry**

Développement d'un test moléculaire d'amplification isothermale (LAMP) pour la détection rapide du virus de la Myxomatose. **Teillaud Angélique, Croville Guillaume, Camus-Bouclainville Christelle, Guérin Jean-Luc, Bertagnoli Stéphane**

Suivi de la propagation dans les populations françaises de lapins de garenne du nouveau virus de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD) caractérisé en 2010. **Le Gall-Reculé Ghislaine, Lemaitre Evelyne, Zwingelstein Françoise, Decors Anouk, Portejoie Yves, Faure Eva, Marchandeaup Stéphane**

Evaluation de l'efficacité d'un nouveau vaccin contre le virus variant de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD). **Le Minor Odile, Beilvert Fanny, Le Moullec Tanguy, Djadour Djedjiga, Martineau Jérôme**

16 h 20

Clôture

Serge LEFEVRE - Président FENALAP
Guy AIRIAU - Président CLIPP

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

P. OSTEIL¹, T. JOLY², M. AFANASSIEFF¹

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

²ISARA-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.

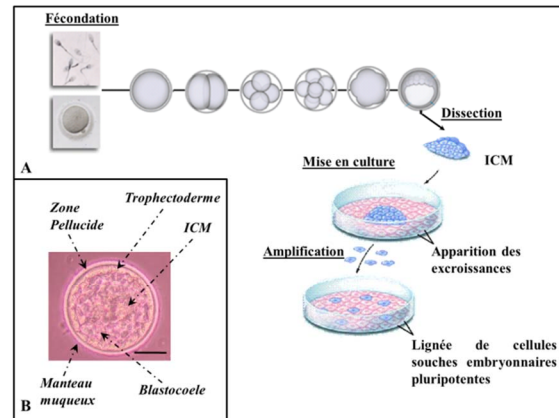
2. L'obtention des PSCs

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.



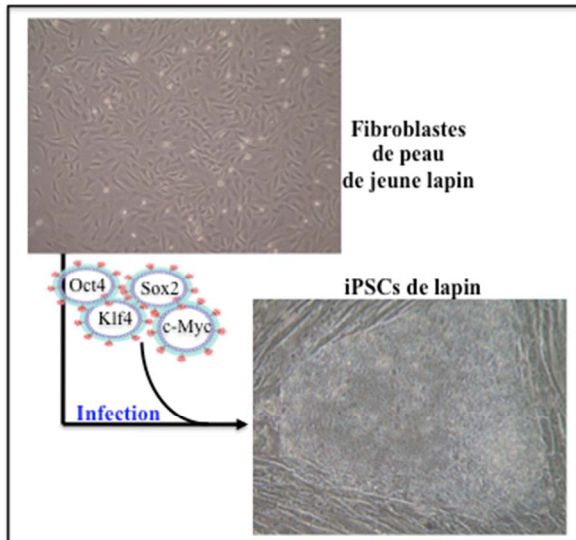
Le principe de la dérivation est de prélever les ICMs de blastocystes et de les mettre individuellement en culture sur des cellules nourricières, dans notre cas des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) dont la croissance a été inactivée par un produit chimique (Mitomycine C). Plus précisément, 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.

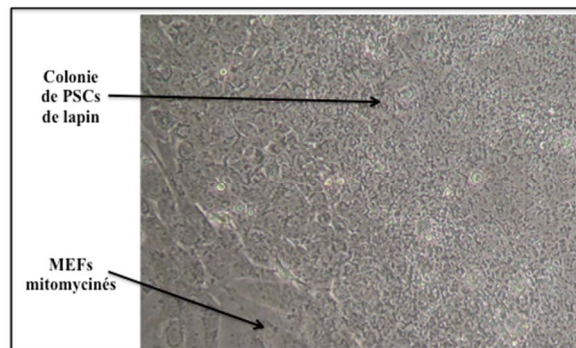


La reprogrammation se produit lentement (environ 6 semaines) et aléatoirement dans quelques cellules qui expriment de façon adéquate les transgènes apportés par les virus. L'efficacité de reprogrammation est très faible ($1/6.10^6$), mais les quelques cellules qui perdent leurs propriétés de cellules 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.

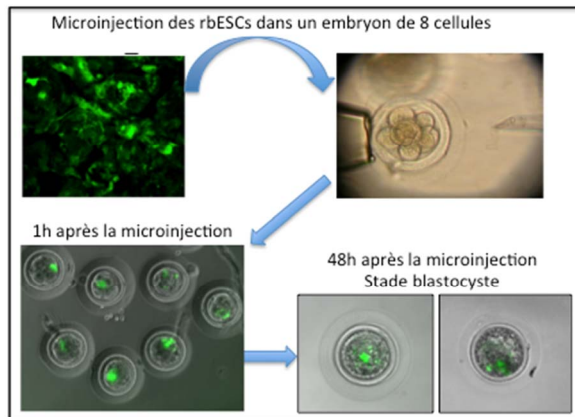
C'est une méthode qui a été beaucoup employée chez les rongeurs avant le développement des PSCs, car le transgène est véhiculé par un rétrovirus modifié de façon à éviter tout risque de propagation virale tout en utilisant les propriétés d'intégration de l'ADN virale dans la cellule infectée. Dans ce 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.