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

Y. TAPPONNIER[1], T. JOLY[2], S. VOISIN[1], N. DANIEL[3], V. DURANTHON[3], M. AFANASSIEFF[1]

[1]Institut Cellule Souche et Cerveau, INSERM U846, INRA USC1361, 69500 Bron, France
[2]ISARA-Lyon, VetAgroSup, UPSP ICE, 69280 Marcy l'Etoile, France
[3]INRA, 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 chimeara. 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

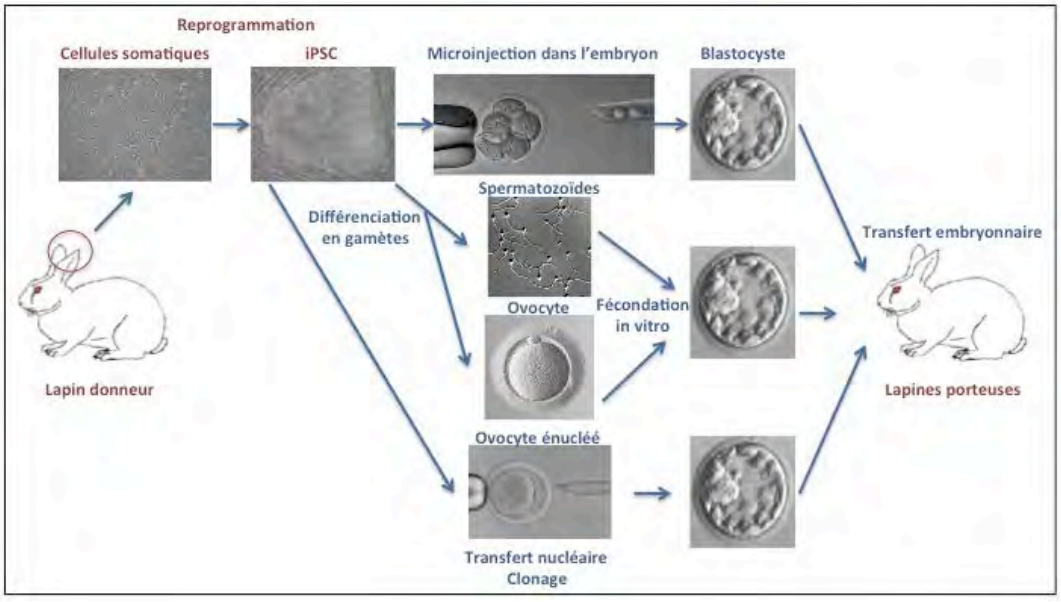
Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont obtenues par reprogrammation génétique de cellules somatiques adultes, telles que des fibroblastes de peau, grâce à la surexpression de gènes spécifiques apportés dans les cellules par des vecteurs dérivés de virus (Takahashi and Yamanaka, 2006). 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 (Wilmut *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 cm^2 ou découpées en petits morceaux de 1 mm^2, 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 Sendaï, 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 chimèrisme 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 chimèrisme somatique et germinal important.

3.4 Amélioration du clonage somatique

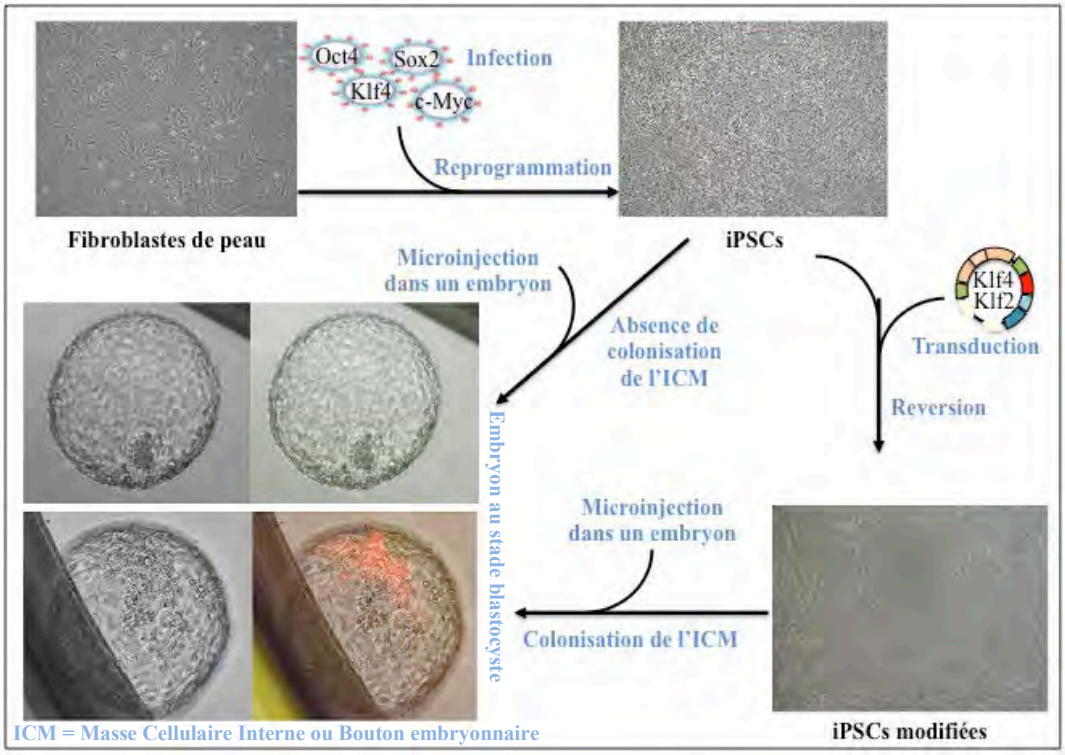
Il est possible d'obtenir un lapereau cloné par transfert du noyau d'une cellule somatique dans un ovocyte énucléé (Chesné *et al.* 2002), mais cette technique est difficile à mettre en œuvre, très coûteuse et a un taux de réussite très faible. Dans cette espèce, le clonage somatique ne donne régulièrement 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 jeux 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 Tapponnier 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., JOSSON-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 medecine. *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., JOUNEAU 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 adul t 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.