

Université de Montréal

La dérivation de cellules souches embryonnaires chez le cheval

par

Simon Laflamme

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.SC.)

en sciences vétérinaires

option reproduction

Août 2010

© Simon Laflamme, 2010

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

La dérivation de cellules souches embryonnaires chez le cheval

présenté par

Simon Laflamme

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Bruce D. Murphy, président-rapporteur

Lawrence C. Smith, directeur de recherche

Sheila Laverty, membre du jury

RÉSUMÉ

Les cellules souches embryonnaires (ES) sont porteuses de grands espoirs en recherche biomédicale dans le but d'apporter un traitement définitif à l'ostéoarthrose. Parce que certaines articulations des chevaux sont similaires à celles des humains, cet animal représente un modèle important dans l'évaluation de stratégies de régénération du cartilage. Cependant, pour expérimenter un traitement par les cellules ES chez le cheval, des cellules ES équine (eES) n'ont toujours pas pu être dérivées. Dans ce contexte, l'objectif principal de cette étude est de dériver des lignées de cellules eES. Le premier objectif de notre étude consiste à optimiser la technique de dérivation des cellules eES. Nous démontrons que la lignée de cellules nourricières et le stade de développement des embryons influencent l'efficacité de la technique de dérivation tandis que l'inhibition de voies de signalisation menant à la différenciation des cellules ES ne l'influence pas sous nos conditions. Le deuxième objectif de notre étude est de caractériser de façon plus approfondie les lignées de cellules eES obtenues. Nous démontrons que les cellules eES dérivées expriment autant des marqueurs associés aux cellules pluripotentes qu'aux cellules différenciées et que l'inhibition de voies de signalisation menant à la différenciation n'influence pas l'expression de ces marqueurs. Pour conclure, nous confirmons avoir dérivé des lignées de cellules semblables aux cellules eES (eES-like) ne correspondant pas complètement aux critères des cellules ES.

Mots clés: Cellule souche embryonnaire, cellules nourricières, blastocyste, inhibiteurs de voies de signalisation, pluripotence, différenciation, cheval

ABSTRACT

Embryonic stem (ES) cells carry high hopes for biomedical research in order to provide definitive treatment for osteoarthritis. The horse is considered to be an important animal model for examining osteoarthritis treatments. However, despite almost thirty years of research, authentic equine ES (eES) cells have not yet been derived. In this context, the main objective of this study was to derive eES cell lines. The first objective of our study was to optimize the technique for deriving eES cells. We show that different feeder cell lines and embryo development stages influence the effectiveness of this technique while the use of cell signalling inhibitors does not influence eES cell derivation. The second objective was to characterize markers of pluripotency and differentiation in eES cell lines by RT-PCR. We demonstrate that the eES cells express both markers associated with pluripotent cells and differentiated cells and that the presence of cell signalling inhibitors in the culture medium does not influence the expression of these markers. In conclusion, we confirm having derived eES-like cells but these do not meet all the molecular criteria of authentic ES cells.

Key words: Embryonic stem cells, feeder cell line, blastocyst, cell signalling inhibitors, pluripotency, differentiation, horse

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT.....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTES DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	IX
1.0 INTRODUCTION	1
2.0 RECENSION DES ÉCRITS.....	3
2.1 Historique et définition des cellules ES.....	3
2.1.1 Historique de dérivation des cellules ES	3
2.1.2 Caractéristiques et propriétés définissant les cellules ES.....	4
2.1.3 La pluripotence	5
2.1.4 L'autorenouvellement.....	6
2.2 Origine et caractérisation des cellules ES.....	6
2.2.1 L'origine des cellules ES	6
2.2.2 La caractérisation des cellules ES.....	7
2.3 Les voies de signalisation régulant l'état pluripotent	11
2.3.1 La voie LIF	12
2.3.2 La voie des MAPK	12
2.3.3 La voie Wnt	13
2.3.4 La voie TGF β	13
2.4 Évaluation de la capacité de différenciation des cellules ES.....	14

2.4.1 Différenciation induite in vitro	14
2.4.2 Différenciation in vivo.....	15
2.5 Application des cellules ES	17
2.5.1 La thérapie cellulaire	17
2.5.2 L'ostéoarthrose	18
2.5.3 Les avantages du cheval comme modèle animal	19
2.5.4 Les études antérieures sur la dérivation de cellules ES chez le cheval	21
2.5.5 La dérivation de cellules ES chez les espèces non permissives	23
3.0 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	25
3.1 L'amélioration de la technique de dérivation des cellules eES-like.....	25
3.1.1 Les cellules nourricières	25
3.1.2 Le stade de développement des embryons.....	26
3.1.3 L'inhibition de voies de signalisation.....	26
3.2 La caractérisation des cellules eES-like	27
4.0 MÉTHODOLOGIE.....	28
4.1 Production des embryons équins servant à la dérivation des cellules eES-like	28
4.1.1 Récupération des ovocytes et maturation in vitro (IVM)	28
4.1.2 Activation parthénogénétique et culture embryonnaire.....	28
4.2 Dérivation des cellules eES	29
4.2.1 Production des lignées de cellules nourricières	29
4.2.2 Isolation et explantation des ICM.....	30
4.3 Culture et production de lignées de cellules eES-like	31

4.4	Caractérisation moléculaire et biochimique des lignées de cellules eES	32
4.5	Analyses statistiques.....	33
5.0	EXPOSÉ ET ANALYSE DES RÉSULTATS	34
5.1	Les conditions influençant la formation de colonies primaires et la production des lignées de cellules eES-like	34
5.1.1	Les cellules nourricières	34
5.1.2	Le stade de développement des embryons.....	37
5.1.3	L'inhibition de voies de signalisation.....	41
5.2	La caractérisation des lignées de cellules eES.....	44
6.0	DISCUSSION GÉNÉRALE	47
7.0	CONCLUSIONS	52
7.1	Amélioration de la technique de dérivation des cellules eES-like	52
7.1	Caractérisation des lignées de cellules eES-like.....	52
8.0	BIBLIOGRAPHIE	53

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Influence de la lignée de cellules nourricières sur l'efficacité de la dérivation des cellules eES-like.....	35
Tableau 2	Influence du stade de développement des embryons sur l'efficacité de la dérivation des cellules eES-like.....	38
Tableau 3	Influence de l'inhibition des voies de signalisation des MAPK, Wnt et TGF β sur l'efficacité de la dérivation des cellules eES-like.....	43

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Morphologie typique des colonies primaires de cellules eES-like.....	38
Figure 2	Morphologie typique des embryons équins parthénogénétiques.....	40
Figure 3	Marquage pour l'activité alcaline phosphatase (AP) des lignées de cellules eES-like produites à P03 par le ESM et le ESM+3i.....	44
Figure 4	Analyse par RT-PCR de marqueurs associés à la pluripotence et à la différenciation des cellules eES-like produites par le ESM et le ESM+3i.....	45

LISTES DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ABAM	Antibiotique-antimycotique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP	Alcaline phosphatase
APC	Adenomatosis polyposis coli
ARN	Acide ribonucléique
β -catenin	Caténine bêta 1
BMP	Protéine morphogénétique osseuse
BSA	Albumine de sérum bovin
bUCF	Fibroblastes de cordon ombilical bovin
COC	Complexe ovocyte-cumulus
EB	Corps embryonnaires
eES	Souches embryonnaires équines
ES-like	Semblables aux cellules souches embryonnaires
ES	Souches embryonnaires
ESM	Milieu de culture de cellules ES
ESM+3i	ESM aux conditions moléculaires définies
eUCF	Fibroblastes de cordon ombilical équin
FBS	Sérum bovin foetal
FGF2	Facteur de croissance de fibroblaste 2
GFP	Protéine fluorescente verte
GSK3 β	Glycogène synthase 3 bêta
hES	Souches embryonnaires humaines

hFF	Fibroblastes fœtaux de cheval
hLIF	LIF d'origine humaine
ICM	Masse cellulaire interne
Id	Inhibiteur de fixation à l'AND
IVM	Maturation in vitro
Jak	Kinase Janus
JE	Jeunes embryons
LIF	Facteur inhibiteur de leucémie
MAPK	Kinases activées par des mitogènes
MAPKK	MAPK kinase
MEF	Fibroblastes embryonnaires de souris
mES	Souches embryonnaires de souris
MMC	Mitomycine C
MSC	Cellules souches mésenchymateuses
PBS	Saline tampon phosphate
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
pES	Souches embryonnaires de primate
rES	Souches embryonnaires de rat
RT	Transcription inverse
SCNT	Transfert de noyau de cellule somatique
SMAD	MAD homologue 1
SSEA	Antigènes embryonnaires de stade spécifique
Stat3	Transducteur de signal et activateur de transcription 3

TE	Trophectoderme
TGF β	Facteurs de croissance transformant bêta
TRA	Antigènes de rejet tumoral
VE	Vieux embryons
ZP	Zone pellucide

1.0 INTRODUCTION

Les cellules ES sont produites à partir de l'explantation des cellules pluripotentes de l'embryon constituant la masse cellulaire interne (ICM). Les colonies primaires ainsi formées sont minutieusement sélectionnées et propagées in vitro jusqu'à la production d'une lignée. Ces lignées sont ensuite caractérisées par des marqueurs associés aux cellules pluripotentes pour en évaluer leur nature. Cependant, l'information que procurent ces marqueurs est limitée et ne permet pas d'affirmer avec certitude qu'une lignée soit pluripotente. Ce n'est qu'en confirmant la contribution in vivo aux tissus en développement que la pluripotence d'une lignée de cellules ES est confirmée. La façon la plus efficace pour tester le potentiel de différenciation des cellules ES est de réintroduire ces cellules à l'intérieur d'un embryon et d'analyser leur contribution au développement.

Parce qu'elles possèdent des propriétés uniques, les cellules ES sont d'une grande utilité en recherche scientifique. Entre autres, les cellules ES peuvent être cultivées in vitro et manipulées génétiquement tout en continuant de s'autorenouveler dans un état pluripotent. Particulièrement, l'intérêt suscité par les cellules ES concerne leur capacité à se différencier en tous les types cellulaires adultes, même après avoir subi plusieurs manipulations in vitro. De cette façon, des cellules spécialisées portant des modifications génétiques ciblées peuvent être produites en grand nombre, offrant ainsi de grands espoirs en médecine régénérative. Par l'entremise de cette technologie, il serait alors possible d'apporter un traitement définitif à des maladies dégénératives pour lesquelles aucun traitement efficace n'est disponible. Ce serait le

cas, entre autres, de l'ostéoarthrose, une maladie affectant principalement le cartilage articulaire.

Le cheval est considéré comme le modèle animal important pour expérimenter de nouvelles thérapies en vue de soigner des blessures et des maladies liées aux articulations. Parce que les chevaux représentent une espèce économique importante et qu'ils sont fréquemment affectés par des troubles articulaires semblables à ceux rencontrés chez l'homme, un intérêt s'est développé pour expérimenter la thérapie par les cellules ES chez le cheval. Cependant, malgré les plus récents progrès, d'authentiques cellules ES n'ont toujours pas pu être dérivées chez cette espèce. À ce jour, les cellules eES obtenues ne démontrent pas la capacité de se différencier en tous les types cellulaires adultes. Par ailleurs, la caractérisation moléculaire et biochimique de ces cellules ne semble pas appropriée pour identifier les types cellulaires pluripotents. Nos travaux se sont donc inscrits dans le but de dériver et de caractériser des cellules eES.

2.0 RECENSION DES ÉCRITS

2.1 Historique et définition des cellules ES

2.1.1 Historique de dérivation des cellules ES

Les toutes premières lignées de cellules ES ont été dérivées en 1981 de façon indépendante par deux groupes de chercheurs à partir d'embryons pré implantation de souris (Martin, 1981, Evans and Kaufman, 1981) Dans les deux protocoles utilisés, la présence d'une monocouche de cellules nourricières inactivées s'est révélée un élément essentiel à l'isolation des cellules ES de souris (mES). Les cellules nourricières étaient alors connues pour jouer deux rôles dans la dérivation de cellules mES: elles agissent en tant que support physique, favorisant l'attachement des cellules mES et elles produisent des facteurs de croissance indéterminés permettant la croissance indifférenciée des cellules ES (Piedrahita et al., 1990, Ouhibi et al., 1995). Quelques années plus tard, il a été démontré qu'un facteur soluble appelé facteur inhibiteur de leucémie (LIF) était requis pour maintenir de façon stable la culture des cellules mES (Williams et al., 1988, Smith et al., 1988). Lorsque les cellules nourricières ou le LIF étaient retirés du système de culture, les cellules mES se différenciaient perdant ainsi leur propriété de pluripotence (Evans and Kaufman, 1981, Williams et al., 1988).

Il fallu attendre quatorze ans pour voir la dérivation de cellules ES chez une espèce autre que la souris. En 1995, la première lignée de cellules ES de primate a été isolée par le groupe de Thomson et ses collègues chez le singe rhésus (Thomson et al.,

1995). Ensuite, trois ans plus tard, l'isolation de la première lignée de cellules ES humaines (hES) a été rapportée (Thomson et al., 1998). Cet écart de dix-sept ans entre les cellules mES et les cellules hES est énorme considérant que la technique d'isolation était sensiblement la même que celle utilisée pour les cellules mES et que des marqueurs identifiant les cellules pluripotentes étaient disponibles. Cependant, il faut noter que chez l'humain, les embryons de bonne qualité sont rares. De plus, les problèmes légaux et les dilemmes éthiques qui entourent l'utilisation de matériel embryonnaire humain compliquent encore davantage la disponibilité des embryons pour l'isolation des cellules hES.

Malgré bientôt près de trente ans de recherche, d'authentiques cellules ES ont seulement pu être dérivées avec succès chez les rongeurs et les primates. Plusieurs études démontrent l'isolation et la caractérisation de cellules semblables aux cellules souches embryonnaires (ES-like) chez le cheval (Saito et al., 2002, Saito et al., 2005, Li et al., 2006), la vache (Cao et al., 2009), le cochon (Vackova et al., 2007), le chat (Gomez et al., 2010), le chien (Hayes et al., 2008), le lapin (Wang et al., 2007) et autres. Cependant, les nombreux rapports décrivant des cellules ES-like ne sont pas parvenus à démontrer toutes les caractéristiques et propriétés propres aux authentiques cellules ES.

2.1.2 Caractéristiques et propriétés définissant les cellules ES

Les cellules ES possèdent un cycle cellulaire très rapide (Burdon et al., 2002) et un ratio noyau-cytoplasme élevé. Elles peuvent être propagées indéfiniment tout en

demeurant indifférenciées. Elles conservent un caryotype diploïde et restent pluripotentes même après un très grand nombre de divisions cellulaires (Zeng, 2007). Lorsqu'elles sont transplantées in vivo dans un embryon, elles peuvent coloniser tous les types cellulaires lors du développement (Auerbach et al., 2000). Ensuite, par gamétogenèse, elles sont capables de la transmission de leur génome aux générations suivantes (Boiani and Scholer, 2005).

2.1.3 La pluripotence

Sans aucun doute, la pluripotence est la principale propriété des cellules ES et elle est en grande partie responsable de l'intérêt porté envers ce type cellulaire. La pluripotence est définie comme étant la capacité d'une cellule à pouvoir former les trois feuilletts germinatifs embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) suite aux processus de différenciation, et par conséquent, produire tous les types cellulaires adultes (Niwa et al., 2001, Solter, 2006). Plus précisément, les cellules pluripotentes doivent être capables de former des cellules germinales et ainsi être en mesure de transmettre leur génome aux générations futures. In vivo, les cellules de l'ICM représentent l'exemple parfait des cellules pluripotentes. La pluripotence est toutefois une propriété difficile à démontrer chez les cellules ES. À ce jour, seulement les cellules mES et les pES répondent à cette définition (Munoz et al., 2009, Tecirlioglu and Trounson, 2007).

2.1.4 L'autorenouvellement

La capacité d'autorenouvellement permet aux cellules ES de se répliquer indéfiniment dans un état indifférencié, donc en maintenant la pluripotence. L'autorenouvellement peut s'effectuer de façon symétrique ou asymétrique (Xi and Xie, 2005). Les cellules ES s'autorenouvellent de façon symétrique in vitro, produisant une descendance pluripotente identique après chaque division cellulaire. Contrairement, les cellules pluripotentes in vivo ont tendance à s'autorenouveler de façon asymétrique, générant une copie exacte d'elles-mêmes et une copie servant pour la différenciation.

2.2 Origine et caractérisation des cellules ES

2.2.1 L'origine des cellules ES

Les cellules ES sont dérivées à partir de cellules provenant d'embryons aux stades pré implantation. Elles sont produites par l'explantation de blastomères d'embryons au stade 2-cellules, d'embryons au stade morula et de ICM d'embryons au stade blastocyste (Lorthongpanich et al., 2008, Geens et al., 2009, Strelchenko et al., 2004, Evans and Kaufman, 1981). Bien qu'elles soient directement issues des cellules pluripotentes de l'embryon, les cellules ES ne possèdent pas de réel équivalent in vivo (Zwaka and Thomson, 2005). En effet, les cellules ES détiennent la particularité de s'autorenouveler dans un état pluripotent et ce, indéfiniment. Contrairement, les cellules pluripotentes retrouvées in vivo ne démontrent cette particularité que pour une courte période de temps pour ensuite subir une différenciation cellulaire. En

culture, les cellules ES sont exposées à plusieurs facteurs extrinsèques n'existant pas in vivo comme des facteurs de croissance présents dans le milieu de culture ou sécrétés par les cellules nourricières (Eiselleova et al., 2008). Leur adaptation à leur nouvel environnement provoque un changement phénotypique résultant en l'acquisition de nouvelles fonctions et permettant aux cellules ES de proliférer indéfiniment dans un état indifférencié. Pour cette raison, les cellules ES sont considérées comme étant une sorte d'artefact de culture et elles représenteraient donc un type cellulaire unique (Zwaka and Thomson, 2005, Buehr and Smith, 2003, Rossant, 2001). Clarifier l'origine des cellules ES pourrait s'avérer d'une grande utilité pour identifier les gènes essentiels au maintien à long terme de l'état pluripotent ainsi que pour dériver des cellules ES pour des espèces chez lesquelles elles sont difficiles à isoler.

2.2.2 La caractérisation des cellules ES

Pour s'assurer de dériver et de maintenir d'authentiques cellules ES en culture, des méthodes ont été développées pour évaluer la pluripotence. Les cellules pluripotentes sont caractérisées par des marqueurs distinctifs reflétant leur état indifférencié. Ces facteurs intrinsèques représentent en quelque sorte la signature moléculaire des cellules pluripotentes. Un marqueur idéal devrait pouvoir identifier uniquement les cellules pluripotentes et devrait disparaître lors de la différenciation. À l'origine, les premiers marqueurs identifiés étaient des marqueurs d'activité enzymatique et des marqueurs de surface cellulaire. Ensuite, avec les progrès en biologie moléculaire, le rôle de certains gènes a été identifié dans le maintien de la pluripotence.

Le premier marqueur identifié a été l'activité de l'enzyme alcaline phosphatase (AP). Cette enzyme est responsable de la déphosphorylation de plusieurs types de molécules (nucléotides, protéines, alcaloïdes et autres). Quoiqu'elle soit fortement exprimée dans les cellules de l'ICM ainsi que dans les cellules ES (Evans and Kaufman, 1981, Thomson et al., 1998, O'Connor et al., 2008), le rôle de l'enzyme AP dans le maintien de l'état pluripotent n'a toujours pas été identifié. Il existe cependant un lien précis entre l'expression de AP et la pluripotence. En effet, il a été démontré qu'une seule cellule mES provenant de cultures établies pouvait engendrer une colonie de cellules positives pour AP (Pease et al., 1990). De plus, la perte de cette capacité est un des premiers indicateurs de différenciation (Palmqvist et al., 2005). Par conséquent, l'expression élevée de l'enzyme AP constitue un marqueur important lors de la caractérisation des cellules ES.

Les cellules ES sont aussi caractérisées par la présence de certains marqueurs de surface comme les protéines de la famille des antigènes embryonnaires de stade spécifique (SSEA) et de la famille des antigènes de rejet tumoral (TRA). Chez les cellules mES et hES, TRA-1-60 et TRA-1-81 sont exprimés fortement (Evans and Kaufman, 1981, Martin, 1981). Quant aux SSEA, il existe un patron différent d'expression de ces protéines entre ces deux espèces. En effet, les cellules mES expriment SSEA-1 seulement tandis que SSEA-3 et SSEA-4 sont exprimés lors de la différenciation et, à l'inverse, les cellules hES expriment SSEA-3 et SSEA-4 alors que SSEA-1 est exprimé lors de la différenciation (Thomson et al., 1998, Solter,

2006). Quoique le rôle de ces protéines dans le maintien de l'état pluripotent ne soit toujours pas déterminé, les protéines de la famille des SSEA et TRA procurent un bon outil pour caractériser les cellules ES et pour suivre les débuts de la différenciation.

Une meilleure compréhension des processus moléculaires impliqués dans le maintien de la pluripotence a permis d'identifier trois gènes comme les maîtres régulateurs de l'état pluripotent: Oct4, Sox2 et Nanog (Rodda et al., 2005, Chambers and Tomlinson, 2009). Ces trois gènes sont essentiels à l'embryogenèse chez les mammifères et ils exercent des rôles cruciaux dans l'autorenouvellement et le maintien de l'état pluripotent des cellules ES (Boiani and Scholer, 2005). Leurs facteurs de transcription agissent comme les principaux modulateurs d'un grand nombre de gènes impliqués dans la régulation du développement (Boyer et al., 2005, Yu and Thomson, 2008) et ils influencent même fortement leur propre expression de façon positive ou négative (Boer et al., 2007).

Oct4 a été le premier gène identifié comme étant un régulateur principal de l'état pluripotent (Nichols et al., 1998). L'expression de Oct4 est spécifique aux cellules pluripotentes de l'ICM, des cellules germinales et des cellules ES, où il joue un rôle indispensable dans le maintien de l'état pluripotent (Zuccotti et al., 2009, Kellner and Kikyo, 2010). Il a été démontré que des embryons déficients pour Oct4 se développent au stade blastocyste mais que leur ICM n'est pas pluripotent (Nichols et al., 1998). Au niveau du développement, Oct4 a pour cible principale, le gène Cdx2.

La diminution de Oct4 chez les cellules de l'ICM et les cellules ES induit la différenciation des cellules dans les lignées trophodermiques par l'augmentation de l'expression de Cdx2 (Niwa et al., 2005). Par ailleurs, il a aussi été démontré que l'augmentation des niveaux de la protéine Oct4 (d'environ 50%) est suffisant pour provoquer la différenciation des cellules ES (Niwa et al., 2005). Pour contrer l'effet de sa surexpression, il existe un mécanisme de limitation de l'expression de Oct4. En effet, le gène Oct4 semble être fortement régulé par les effets combinés des facteurs de transcription Sox2 et Oct4 lui-même (Okumura-Nakanishi et al., 2005). Il a été démontré qu'une faible augmentation des niveaux de Sox2 ou de Oct4 entraîne la répression de l'activité du promoteur du gène Oct4 (Boer et al., 2007). Ces résultats suggèrent que les cellules ES possèdent un réseau de régulation maintenant l'expression de Oct4 au niveau optimal, faisant en sorte de maintenir l'état pluripotent (Pan et al., 2002).

Comme Oct4, l'expression de Sox2 est aussi détectée chez les cellules ES (Avilion et al., 2003, Chambers and Tomlinson, 2009). Sox2 fait coopération avec Oct4 afin de réguler l'expression de certains gènes dont Nanog (Rodda et al., 2005). De façon similaire à Oct4, la diminution et l'augmentation de la protéine Sox2 entraînent la différenciation des cellules ES (Kopp et al., 2008). Cette différenciation des cellules ES par la diminution de Sox2 peut cependant être renversée en forçant l'expression de Oct4, et par conséquent, il est considéré que le principal rôle de Sox2 chez les cellules ES est le maintien de l'expression de Oct4 (Masui et al., 2007).

Nanog est un gène qui a été découvert en 2003 par deux groupes de façon indépendante (Chambers et al., 2003, Mitsui et al., 2003). Nanog supporte l'autorenouvellement des cellules mES en l'absence de LIF, une cytokine importante à leur culture indifférenciée (Mitsui et al., 2003, Chambers et al., 2003). Il a été démontré que Nanog fait partie d'un réseau de transcription régularisant l'activité de plusieurs gènes en collaboration avec Oct4 et Sox2 (Boyer et al., 2005, Loh et al., 2006). Par ailleurs, les cellules mES négatives pour Nanog ont tendance à se différencier en cellules extraembryonnaires (Mitsui et al., 2003). Cependant, contrairement à Oct4 et Sox2, il est possible de maintenir en culture des cellules mES n'exprimant pas Nanog et qui conservent leur propriété de pluripotence et d'autorenouvellement (Chambers et al., 2007). Pour cette raison, il semble que Nanog ne soit pas essentiel pour établir la pluripotence. Il agirait plutôt pour stabiliser et renforcer l'état pluripotent des cellules mES (Chambers et al., 2007). Sa principale fonction lors du développement serait l'inhibition de la transcription de Gata6, une protéine causant la différenciation en endoderme extraembryonnaire (Wang et al., 2006).

2.3 Les voies de signalisation régulant l'état pluripotent

En plus des facteurs intrinsèques, la pluripotence est affectée par plusieurs facteurs extrinsèques provenant de différentes sources. Bien que la plupart des ses facteurs soient inconnus, quelques uns ont pu être identifiés et leur rôle dans le maintien de la pluripotence ont pu être déterminés.

2.3.1 La voie LIF

LIF est connu pour promouvoir fortement la pluripotence des cellules mES même en absence de cellules nourricières (Williams et al., 1988, Smith et al., 1988). Chez les cellules mES, la liaison de LIF à son récepteur transmembranaire provoque la phosphorylation du transducteur de signal et activateur de transcription 3 (Stat3) via l'activation de la kinase Janus (Wakayama et al., 2007, Burdon et al., 2002). L'activation de Jak-Stat3 permet à Stat3 de se déplacer du cytoplasme vers le noyau pour y activer les gènes Klf4 et Tbx3, deux gènes importants dans l'activation de Sox2 et Nanog (Niwa et al., 2009). Par ailleurs, il a été démontré que la répression de Stat3 induit la différenciation des cellules mES (Niwa et al., 1998), tandis que son activation artificielle est suffisante pour maintenir la pluripotence en absence de LIF (Matsuda et al., 1999). Cependant, contrairement aux cellules mES, les cellules hES et pES ne requièrent pas la présence de LIF pour maintenir leur état pluripotent (Thomson et al., 1998, Humphrey et al., 2004), suggérant qu'il existe des différences interspécifiques pour les rôles de cette voie de signalisation.

2.3.2 La voie des MAPK

La fixation de LIF à son récepteur initie aussi une voie de signalisation antagoniste à la pluripotence. En effet, LIF active aussi la voie des kinases activées par des mitogènes (MAPK) (Kolch, 2000). Cette voie de signalisation est connue pour activer la transcription de gènes associés à la différenciation des cellules mES (Burdon et al., 2002). Il a été démontré que l'inactivation de la voie MAPK par l'inhibition de l'enzyme MAPK kinase (MAPKK) favorise l'autorenouvellement des

cellules mES (Nichols et al., 2009). Il est suggéré que l'équilibre entre les voies de signalisation LIF et MAPK joue un rôle important dans le maintien de la pluripotence des cellules mES (Burdon et al., 2002). L'enzyme MAPKK peut être inhibée artificiellement par les composés chimiques PD032591, PD184352 et U0126 (Bain et al., 2007).

2.3.3 La voie Wnt

La voie Wnt contribue aussi au maintien l'état pluripotent des cellules ES. La liaison du signal Wnt à son récepteur inhibe l'action de glycogène synthase 3 bêta (GSK3 β) et de adenomatosis polyposis coli (APC), permettant à catenine bêta 1 (β -catenin) de migrer vers le noyau d'y activer certains gènes (Willert and Jones, 2006). L'ajout de protéines de la famille Wnt contribue au maintien de l'état pluripotent des cellules ES par l'activation de Stat3 de la voie de signalisation du LIF (Hao et al., 2006). Par ailleurs, l'inhibition de GSK3 β par le composé chimique CHIR99021 favorisent le maintien de l'état pluripotent des cellules mES en l'absence de LIF en permettant l'action de β -catenin sur le noyau (Sato et al., 2004).

2.3.4 La voie TGF β

Certains membres de la superfamille des facteurs de croissance transformant bêta (TGF β) participent à la régulation de l'état pluripotent mais de façon différente pour les cellules mES et les hES. Il s'agit en autres des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) et de activin, aussi connus pour jouer divers rôles dans

l'homéostasie cellulaire (Ogawa et al., 2007). Chez les cellules mES, BMP4 active MAD homologue 1 (SMAD), qui à son tour, régule positivement l'expression d'inhibiteurs de fixation à l'ADN (Id) (Wu and Hill, 2009). En combinaison avec LIF, Id supprime la différenciation des cellules mES (Ying et al., 2003). Quant à activin, il a été démontré qu'il est impliqué positivement dans la propagation des cellules mES (Ogawa et al., 2007). Inversement, chez les cellules hES, l'activation de la voie de signalisation TGF β par BMP4 induit la différenciation des cellules vers les lignées trophoblastiques (Xu et al., 2002). L'inhibition de cette voie de signalisation est donc importante pour le maintien l'état pluripotent des cellules hES. Cette inhibition peut être effectuée par le composé chimique A83-01 (Tojo et al., 2005).

2.4 Évaluation de la capacité de différenciation des cellules ES

2.4.1 Différenciation induite in vitro

La différenciation in vitro des cellules ES peut être induite de deux façons. D'abord, la différenciation peut être produite en cultivant les cellules ES en suspension. De cette manière, les cellules s'agglomèrent pour former des masses de cellules différenciées formant des corps embryonnaires (EB) (Martin and Evans, 1975). Ces EB sont similaires morphologiquement à des embryons, d'où leur nom, mais sont désordonnés et ne présentent pas d'organisation axiale (Doetschman et al., 1985). Les EB peuvent ensuite être remis en culture à la surface d'un Pétri pour observer les différents types cellulaires produits.

La différenciation in vitro des cellules ES peut aussi être dirigée de façon précise par des facteurs de croissance et des cytokines spécifiques. Des types cellulaires particuliers peuvent ainsi être produits. Par exemple, des protocoles précis de différenciation permettent d'obtenir des cellules hématopoïétiques, cardiaques ou hépatiques et autres (Keller, 2005). Cette méthode de différenciation des cellules ES représente la base de la médecine régénérative. La production de tissu spécialisé pourrait servir en thérapie cellulaire par remplacement de tissu. Par ailleurs, la différenciation des cellules ES in vitro peut aussi contribuer aux connaissances sur les processus impliqués en biologie du développement pour des espèces chez qui le matériel embryonnaire est peu accessible.

2.4.2 Différenciation in vivo

La technique de différenciation in vivo la plus simple est la formation de tératomes. Un tératome est une tumeur constituée de plusieurs types cellulaires représentant les trois feuillets germinatifs embryonnaires (Damjanov and Andrews, 2007). Des tératomes peuvent être formés par la transplantation de cellules ES à des souris immunodéficientes, démontrant ainsi leur différenciation en des types cellulaires provenant des trois feuillets germinatifs embryonnaires (Solter, 2006). Cependant, cette méthode ne permet pas de déterminer avec certitude la différenciation des cellules ES en tous les types cellulaires adultes dont les cellules germinales.

La technique couramment utilisée pour évaluer le potentiel de différenciation des cellules mES est le chimérisme embryonnaire (Tam and Rossant, 2003). Pour produire un embryon chimère, quelques cellules ES sont réintroduites dans un embryon pré implantation. Au cours du développement, les cellules ES présentes à l'intérieur de l'embryon peuvent s'incorporer à l'ICM et coloniser tous les organes de l'individu. Le nouvel individu sera donc porteur de cellules possédant deux génomes différents, d'où le nom chimère. Ensuite, pour confirmer le potentiel de différenciation, il est possible de retracer les cellules ES par des marqueurs préalablement insérés dans les cellules ES comme la protéine verte fluorescente (GFP) (Tam and Rossant, 2003).

Finalement, le test le plus robuste pour évaluer la contribution des cellules ES aux tissus en développement d'un individu est la complétion tétraploïde (Nagy et al., 1993). Cette technique consiste à injecter des cellules ES à l'intérieur d'un embryon tétraploïde produit par la fusion des deux blastomères après le premier clivage. Les cellules tétraploïdes de l'embryon forment les tissus extraembryonnaires mais sont incapables de former les tissus embryonnaires (Tarkowski et al., 1977). De cette façon, le développement du fœtus des embryons tétraploïdes injectés par des cellules ES est exclusivement produit par les cellules ES (Nagy et al., 1993). L'individu sera alors entièrement constitué du génome des cellules ES et un simple test par microsatellite permettra de le confirmer. La méthode de la complétion tétraploïde est le test ultime pour confirmer la pluripotence des cellules ES. Elle a été démontrée

chez les cellules mES et elle a produit des individus sains et fertiles (Eggan and Jaenisch, 2003).

2.5 Application des cellules ES

2.5.1 La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire par remplacement de tissu est certainement l'application potentielle la plus importante des cellules ES. Les cellules ES peuvent être modifiées génétiquement contre une maladie et, en forçant le signal de différenciation approprié, ces cellules représenteraient une source illimitée de cellules spécialisées et saines. Il serait alors envisageable d'apporter un traitement définitif pour soigner des maladies dégénératives telles que l'ostéoarthrose en remplaçant les tissus endommagés par des tissus sains (Gerecht-Nir and Itskovitz-Eldor, 2004).

Par ailleurs, les cellules ES possèdent la particularité de pouvoir être immunocompatibles avec le patient. En effet, combinées à la technologie de clonage par transfert de noyau de cellule somatique (SCNT), des embryons possédant le même génome que le patient peuvent être produits (Gurdon and Colman, 1999). Des lignées de cellules ES peuvent être dérivées à partir de ces embryons pour éventuellement être utilisées en thérapie cellulaire (Wakayama et al., 2006). La possibilité d'utiliser des cellules ES immunocompatibles en thérapie cellulaire représente un avantage important puisque de cette façon, les possibilités de rejet de la greffe chez le receveur seraient écartées.

2.5.2 L'ostéoarthrose

L'ostéoarthrose est une maladie du système musculosquelettique affectant principalement les articulations des genoux, des hanches, de la colonne vertébrale, des pieds et des mains. Elle est le résultat d'un déséquilibre entre les propriétés de résistance physicochimique du cartilage et des stress mécaniques qui lui sont appliqués. Ce déséquilibre provoque une dégradation progressive du cartilage articulaire, entraînant la formation d'ostéophytes, l'épaississement de l'os sous-chondral et la formation de kystes osseux sous-chondraux. Les symptômes de l'ostéoarthrose sont caractérisés par de l'inflammation, des raideurs et des douleurs articulaires et dans des cas extrêmes, la perte de fonction des articulations touchées. Plusieurs facteurs sont impliqués dans la pathogenèse de l'ostéoarthrose incluant l'âge, l'obésité, des traumatismes et des facteurs génétiques (Goldring and Goldring, 2007). Il est estimé que l'ostéoarthrose touche environ 12% de la population Américaine âgée de 25 à 74 ans (Lawrence et al., 2008) et que cette maladie dégénérative des articulations constitue la cause la plus répandue d'invalidité en Amérique (Aigner and McKenna 2002).

Le cartilage articulaire est un biomatériau hautement spécialisé composé d'une matrice non-vascularisée, innervée et alymphatique synthétisée par les chondrocytes (Muir, 1995). En raison de ses caractéristiques, le cartilage articulaire possède des capacités de régénération limitées, ce qui constitue le principal problème dans l'élaboration d'un traitement contre l'ostéoarthrose. À ce jour, les traitements disponibles consistent seulement en des moyens pour diminuer l'inflammation et la

douleur par la prise de médicaments. Cependant, la thérapie par les cellules ES apportent l'espoir d'un traitement définitif à cette maladie.

2.5.3 Les avantages du cheval comme modèle animal

Le cheval est une espèce domestique ayant une grande importance économique. Il est estimé que les blessures empêchant les chevaux de courses à prendre part aux compétitions coûtent environ 6.5 milliards de dollars américains par année à l'industrie des courses équestres (Teciirlioglu and Trounson, 2007). Plusieurs animaux en bas âge doivent être retirés de façon permanente des courses et des compétitions en raison de blessures affectant les tissus musculosquelettiques. Une des causes de ces blessures est l'ostéoarthrose, une maladie provoquant de fréquents problèmes de boiterie chez le cheval (Frisbie and McIlwraith, 2000).

Le cheval est déjà établi comme un important modèle animal dans l'étude de l'ostéoarthrose (Frisbie et al., 2006). En effet, les articulations des chevaux présentent plusieurs avantages comparativement aux autres modèles animal dont leur taille et l'épaisseur et la dimension du cartilage, lesquels reflètent plus précisément le cartilage articulaire chez l'homme (Frisbie et al., 2006). Par ailleurs, le cheval est aussi considéré comme un modèle animal important pour étudier les blessures aux ligaments et aux tendons puisque ces blessures observées chez le cheval sont similaires à celles observées chez l'humain (Smith and Webbon, 2004). Pour ces raisons, le cheval représente un modèle animal de choix pour tester la thérapie par les cellules souches pour soigner les troubles articulaires (Koch and Betts, 2007).

La thérapie par les cellules souches actuellement proposée utilise les cellules souches mésenchymateuses (MSC). Cependant, la thérapie par MSC présente plusieurs limitations. Entre autres, les MSC demandent beaucoup de temps pour leur expansion et elles possèdent un potentiel limité pour la prolifération et la différenciation *in vitro* (Barry, 2003). Par ailleurs, une étude clinique a démontré que l'injection de MSC dans l'articulation fémoro-patellaire n'améliore pas l'apparence histologique ou la composition biochimique des lésions du cartilage à long terme (Wilke et al., 2007). De plus, l'injection de MSC dans l'articulation carpale de chevaux ne prévient pas la détérioration du cartilage dans le cas d'ostéoarthrose expérimentale (Frisbie et al., 2009), signifiant que ce type de cellules souches n'est pas efficace pour régénérer le cartilage défectueux.

Pour réussir là où les MSC échouent, les cellules ES disposent de caractéristiques intéressantes. En effet, contrairement aux MSC, les cellules ES peuvent être produites en très grand nombre car elles possèdent des potentiels illimités de prolifération et de différenciation (Burdon et al., 2002). De plus, elles peuvent être immunocompatibles avec le receveur si elles sont produites en combinaison avec la technologie SCNT (Gurdon and Colman, 1999). Finalement, elles peuvent subir des modifications génétiques pour potentiellement produire des tissus sains et ainsi guérir des maladies génétiques par remplacement de tissu (Brignier and Gewirtz, 2010). Cependant, avant d'utiliser la thérapie par cellules ES chez les humains, l'innocuité de la greffe de tissu provenant de cellules ES doit être testée.

Contrairement aux cellules MSC, les cellules ES indifférenciées ne peuvent pas être utilisées directement pour la transplantation car elles représentent un risque de formation de tératome (Keller, 2005). L'utilisation du modèle animal est donc requise pour comprendre le comportement des cellules ES suite à leur injection in vivo et leur potentiel pour traiter des maladies.

2.5.4 Les études antérieures sur la dérivation de cellules ES chez le cheval

Malgré l'importance dont représente la production de lignées de cellules ES, peu d'études se sont attardées à cette tâche chez le cheval. Seulement deux groupes ont fait état de la dérivation de cellules eES-like à partir d'embryons équins produits in vivo (Saito et al., 2002, Li et al., 2006). Malheureusement, la différenciation in vivo de ces cellules eES-like en tous les types cellulaires n'a pas pu être démontrée.

Les connaissances sur l'embryologie équine et sur la biologie des cellules eES étant limitées ou même inexistantes, la dérivation des cellules eES repose donc principalement sur la technique de dérivation de cellules mES. Dans les rapports de dérivation de cellules eES-like, l'isolation des ICM s'effectuait par immunochirurgie (Li et al., 2006) ou par microchirurgie (Saito et al., 2002). L'explantation des ICM employait un système de co-culture en présence de cellules nourricières, un milieu de culture provenant de la méthode de dérivation des cellules mES (Williams et al., 1988) et l'addition exogène de LIF (Li et al., 2006, Saito et al., 2002). Les cellules eES-like sont caractérisées par la formation de colonies ressemblant à celles formées par les cellules mES, par un ratio noyau-cytoplasme élevé et par un nucléole

proéminent (Li et al., 2006). Contrairement aux cellules mES, les cellules eES-like se différencient en l'absence de cellules nourricières mais en présence de LIF (Saito et al., 2002) ressemblant aux cellules hES pour cette caractéristique (Thomson et al., 1998). Sous ces conditions, elles forment des EB et se différencient in vitro en des types cellulaires représentant les trois feuillets germinatifs (Li et al., 2006). Il est considéré que les cellules eES-like sont dépendantes de la présence des cellules nourricières pour maintenir leur état indifférencié mais que la lignée de cellules nourricières utilisée ne semble pas influencer leur dérivation (Li et al., 2006, Saito et al., 2002). Quant au LIF, son rôle ne semble pas faire l'unanimité. En effet, un groupe rapporte que le LIF n'est pas requis (Saito et al., 2002) tandis que l'autre groupe soutient que le LIF est essentiel pour la culture de cellules eES-like dans un état indifférencié (Li et al., 2006).

Les cellules eES-like expriment des marqueurs utilisés communément pour identifier les cellules mES et hES. Elles montrent une activité AP élevée, elles expriment SSEA-1, TRA-1-60 et TRA-1-81 et sont positivement pour l'expression du gène Oct4 (Li et al., 2006, Saito et al., 2002). Par contre, leur différenciation in vivo n'a pas pu être démontrée. Aucun tératome ne s'est formé après l'injection de eES-like à des souris immunodéficientes, démontrant ainsi une différence significative entre les phénotypes des cellules eES-like, des cellules mES et des cellules hES (Li et al., 2006). Les résultats de ces études prouvent donc que les cellules eES-like ne peuvent pas être considérées comme d'authentiques cellules ES. D'autres connaissances sur la biologie des cellules eES sont nécessaires. D'une part, la caractérisation de ces

cellules doit être approfondie. D'autres marqueurs de pluripotence, Sox2 et Nanog particulièrement, en plus de marqueurs de différenciation, Cdx2, EOMES ou d'autres, sont requis pour évaluer de façon plus précise la nature des cellules eES-like. D'autre part, des preuves de contribution in vivo aux tissus en développement, particulièrement aux lignées de cellules germinales, sont requises pour affirmer hors de tout doute que ces cellules sont belles et bien pluripotentes.

2.5.5 La dérivation de cellules ES chez les espèces non permissives

Jusqu'à dernièrement, la dérivation de cellules ES était exclusive à la souris et à certaines espèces de primates. Les nombreuses connaissances sur la biologie de ces deux espèces ont facilité la compréhension des mécanismes maintenant l'état pluripotent des cellules mES et des pES. L'inefficacité de la dérivation d'authentiques cellules ES chez d'autres espèces n'est toujours pas clairement expliquée. Cependant, il est maintenant établi qu'il existe des différences interspécifiques dans les processus reliés au maintien de la pluripotence (Pan et al., 2002). Selon plusieurs, les progrès dans la dérivation des cellules ES d'espèces non permissives proviendront des recherches se concentrant sur la compréhension des mécanismes spécifiques maintenant l'état pluripotent, sur l'identification de marqueurs appropriés aux cellules souches et sur l'optimisation des conditions de culture pour chaque espèce (Munoz et al., 2009, Keefer et al., 2007).

Dernièrement, un pas en avant a été effectué dans la dérivation des cellules ES pour les espèces non-permissives. En effet, des cellules ES de rat (rES) ont pu être

obtenues par une stratégie qui consiste à protéger les cellules ES de signaux induisant la différenciation (Buehr et al., 2008). Plus précisément, l'inhibition de l'activation de la voie de signalisation des MAPK et de la molécule GSK3 β a permis de maintenir en culture des cellules rES capables de coloniser de multiples tissus et de contribuer aux lignées de cellules germinales chez des individus chimériques viables. Cette stratégie, bien que novatrice, repose cependant sur les connaissances de voies de signalisation spécifiques menant à la différenciation. Des différences interspécifiques ont été démontrées à ce niveau. Par exemple, l'activation de la voie TGF β est requise pour la croissance indifférenciée des cellules mES (Ying et al., 2003). Contrairement, son inactivation est nécessaire pour maintenir l'état pluripotent des cellules hES et pES (Xu et al., 2002). Malgré tout, il semble exister quelques similitudes entre les espèces permettant l'utilisation de cette stratégie chez des espèces pour lesquelles les connaissances ne sont pas encore disponibles. Par exemple, l'activation des voies Wnt et MAPK est requise pour maintenir l'état pluripotent autant pour les cellules mES que pour les cellules hES (Sato et al., 2004, Burdon et al., 2002).

3.0 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

3.1 L'amélioration de la technique de dérivation des cellules eES-like

Les essais antérieurs de dérivation de cellules eES-like utilisent les conditions décrites pour la dérivation de cellules mES. Toutefois, ces conditions n'ont pas permis de produire des cellules eES pouvant se différencier en tous les types cellulaires adultes. Par conséquent, la technique de dérivation des cellules ES doit être adaptée chez le cheval. Notre étude avait pour premier objectif d'améliorer les techniques de dérivation des cellules eES-like à partir d'embryons équins produits in vitro. Dans cet optique, nous avons identifié trois facteurs influençant la dérivation des cellules eES-like : les cellules nourricières, le stade de développement des embryons et l'inhibition de voies de signalisation menant à la différenciation des cellules ES. Nous proposons que la technique de dérivation des cellules eES n'est pas optimale chez le cheval et que l'amélioration de cette technique permettra de dériver et de caractériser des cellules eES pluripotentes.

3.1.1 Les cellules nourricières

Différentes lignées de cellules nourricières ont déjà été utilisées pour la dérivation de cellules eES-like mais elles n'ont jamais été comparées en fonction de leur efficacité à promouvoir la dérivation de cellules eES-like. Selon leur capacité de production de facteurs de croissance et de protéines d'adhésion, certaines lignées de cellules nourricières peuvent favoriser la dérivation de cellules eES-like. Nous soutenons

donc que l'efficacité de dérivation de cellules eES-like est influencée par les lignées de cellules nourricières utilisées.

3.1.2 Le stade de développement des embryons

La ICM représente une population de cellules in vivo en constante évolution. Au cours du développement de l'embryon, ces cellules acquièrent et perdent certaines propriétés. Comme les cellules ES proviennent directement de l'explantation des cellules constituant la ICM, le stade de développement des embryons constitue un facteur important dans la dérivation des cellules ES. Nous proposons que l'efficacité de la dérivation de cellules eES-like est favorisée par l'utilisation des ICM provenant des embryons au stade jeune blastocyste.

3.1.3 L'inhibition de voies de signalisation

L'intérêt grandissant dans le domaine des cellules ES a entraîné de nombreuses études à s'intéresser aux processus impliqués dans la pluripotence et la différenciation cellulaire. Les récentes connaissances acquises sur le sujet ont permis l'élaboration de nouvelles stratégies pour maintenir l'état pluripotent des cellules ES. Essentiellement, la stratégie employée qui a permis de dériver des cellules rES consistait à protéger les cellules ES des signaux menant à la différenciation. Donc, à l'inverse de s'efforcer d'activer les signaux appropriés, l'état pluripotent pourrait être maintenu en bloquant les signaux de différenciation par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. Au cours de notre étude, cette stratégie a été utilisée pour la dérivation

des cellules eES-like dans le but d'en améliorer l'efficacité. Nous proposons que l'inhibition de voies de signalisation menant à la différenciation favorisera l'expression de marqueurs associés à la pluripotence et réprimera l'expression de marqueurs associés à la différenciation.

3.2 La caractérisation des cellules eES-like

En plus d'améliorer l'efficacité de dérivation des cellules eES-like, nous envisageons que l'impact de l'inhibition de voies de signalisation conduisant à la différenciation pourra être détecté au niveau moléculaire. Plus précisément, nous supposons que l'utilisation d'inhibiteurs des voies de signalisation des MAPK, Wnt et TGF β favorisera l'expression de gènes associés à la pluripotence et bloquera l'expression de gènes associés à la différenciation. Par ailleurs, les rapports de dérivation des cellules eES-like rapportés dans la littérature présentent une caractérisation limitée des ces cellules, ce qui représente leur principale lacune. Plusieurs gènes impliqués dans le maintien de l'état pluripotents et dans les processus de différenciation ont maintenant été identifiés. Une caractérisation moléculaire plus approfondie permettrait d'en apprendre d'avantage sur la nature des cellules eES-like et pourrait fournir d'importantes connaissances dans les processus impliqués dans le maintien de l'état pluripotent des cellules eES. Notre étude avait donc pour deuxième objectif d'approfondir la caractérisation des cellules eES-like.

4.0 MÉTHODOLOGIE

4.1 Production des embryons équins servant à la dérivation des cellules eES-like

4.1.1 Récupération des ovocytes et maturation in vitro (IVM)

Les ovaires équins ont été obtenus de l'abattoir. Les complexes ovocyte-cumulus (COC) ont été récupérés en aspirant les follicules ovariens avec l'aide d'une seringue et d'une aiguille. Les COC ont ensuite été lavés dans un milieu DMEM-F12 (Sigma) supplémenté de 1% BSA (Sigma) et placés en IVM dans un milieu constitué de DMEM F-12, 10% FBS (Gibco), 5 µl/ml gentamicine (Sigma), 5 µg/ml d'hormone lutéinisante (LH, Bioniche, Belleville, ON, Canada), 1 µg/ml d'hormone folliculo-stimulante (FSH, Folltropin-V, Bioniche), 50 ng/ml de facteur de croissance épidermique (EGF, Sigma) et 100 ng/ml de facteur de croissance insuline-1 (IGF-1, Invitrogen). Après 20 heures IVM, les cellules de cumulus ont été enlevées des ovocytes en pipetant les COC dans une solution 400U hyaluronidase (Sigma). Les ovocytes dénudés et viables ont ensuite été remis IVM pour 20 heures de plus.

4.1.2 Activation parthénogénétique et culture embryonnaire

Après 40 heures de IVM, les ovocytes ayant expulsés un premier globule polaire ont été sélectionnés pour l'activation parthénogénétique. Les ovocytes ont été activés par une incubation dans une solution 8.5 µM d'ionomycine (Sigma) pour 4 minutes suivi d'une incubation de 3 heures dans une solution 2 mM de 6-diméthylaminopurine

(Sigma). Ensuite, les ovocytes ont été lavés et mis en culture dans un milieu DMEM F-12 additionné de 5% FBS pour 7 à 12 jours.

4.2 Dérivation des cellules eES

4.2.1 Production des lignées de cellules nourricières

Les fibroblastes ombilicaux bovins (bUCF) et équins (eUCF) ont été isolés à partir de la structure du cordon ombilical nommée *Wharton's jelly*. Brièvement, des biopsies ont été prélevées sur le cordon ombilical de nouveaux nés immédiatement après la parturition. Les échantillons ont été transportés jusqu'au laboratoire dans du PBS stérile (Sigma) contenant 2% antibiotique-antimycotique (Gibco). Le *Wharton's jelly* a été isolé, coupé finement et digéré dans une solution 5mg/ml collagénase type IV (Sigma) pour 3 heures. Les cellules dissociées ont ensuite été lavées deux fois, mises en culture dans un milieu DMEM (Sigma), 10% FBS, 1X antibiotique-antimycotique (ABAM, Gibco), dans un flask de 25cm² à 38.5°C, 5% CO₂ dans l'air jusqu'à confluence. Finalement, les cellules ont été trypsinisées et congelées dans l'azote liquide pour des cultures subséquentes.

Les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) de la lignée CF-1 ont été achetés de l'*American Type Culture Collection* (ATCC, USA). Les MEF ont été cultivés pour deux passages avant d'être congelés et utilisés comme cellules nourricières.

4.2.2 Isolation et explantation des ICM

Les embryons obtenus par activation parthénogénétique ont été séparés en deux catégories d'âge. Les embryons de jour 7 à 9 post activation représentant le stade de développement jeune blastocyste et constituaient la catégorie des jeunes embryons (JE). Les embryons de jour 10 à 12 post activation, représentant les stades de développement blastocyste élargi et blastocyste en éclosion, constituaient la catégorie de vieux embryons (VE). Pour isoler l'ICM des blastocystes, la zone pellucide (ZP) et les cellules de trophoctoderme (TE) doivent être enlevées. Ces deux structures ont été digérées par l'incubation des embryons dans une solution de pronase 10 mg/ml (Sigma). Lorsque le TE commençait à se disperser, les embryons étaient retirés de la pronase pour protéger les cellules de la ICM. Les ICM ont ensuite été déposées sur une monocouche de cellules nourricières mitotiquement inactivées par un traitement de 3 heures à la mitomycine C (MMC, Sigma) dans milieu de culture pour cellules ES (ESM) constitué de 85% DMEM, 15% FBS (HyClone, Logan, UT), 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Sigma), 1% non-essential amino-acids (Gibco), 200 μ M L-glutamine (Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen), 0.04 μ g/ml LIF d'origine humaine (hLIF) (Chemicon International, Temecula, CA) ou dans ESM additionné de 2.5 μ M inhibiteur TGF (StemGent #A83-01), 3 μ M inhibiteur GSK (StemGent #CHIR99021) et 0.5 M inhibiteur MAPK (StemGent #PD032591) (ESM+3i).

4.3 Culture et production de lignées de cellules eES-like

La culture des cellules eES-like s'est effectuée à partir des colonies primaires après l'explantation des ICM sur les monocouches de cellules nourricières. Après trois jours de culture, les colonies primaires ont été dissociées mécaniquement en plusieurs fragments et repiqués sur une nouvelle monocouche de cellules nourricières. À ce stade, la culture était considérée au premier passage (P01). Lors du P01 et des passages suivants, le milieu de culture était changé quotidiennement. Pour le P02 et les passages suivants, les cellules eES-like ont été cultivées pour trois jours et les passages ont été effectués par dissociation enzymatique à la TrypLE (Gibco), un substituant d'origine non-animal de la trypsine. À P03, c'est-à-dire après 12 jours de culture, les cultures étaient composées d'assez de cellules eES-like pour effectuer les tests de caractérisation moléculaires. C'est à ce passage que l'on considérait avoir établi une lignée de cellules eES-like.

Dans le but d'améliorer la technique de dérivation des cellules eES-like, les impacts de la lignée de cellules nourricières (MEF vs eUCF vs bUCF), du stade de développement des embryons (JE vs VE) et de l'inhibition de voies de signalisation (ESM vs ESM+3i) ont été évalués. Les taux de formation des colonies primaires et de production de lignées de cellules eES-like ont été vérifiés en fonction de ces trois facteurs. Le facteur du stade de développement des embryons a été testé en présence des MEF uniquement et l'inhibition de voies de signalisation a été testée en présence des MEF et avec des JE.

4.4 Caractérisation moléculaire et biochimique des lignées de cellules eES

Dans le but d'approfondir la caractérisation des cellules eES-like et pour évaluer les effets de l'inhibition de voies de signalisation par le ESM+3i, une caractérisation moléculaire et biochimique des lignées produites a été effectuée. D'abord, l'expression de l'enzyme AP a été testée en utilisant un kit de détection AP (Chemicon International). Ensuite, l'expression des gènes associés à la pluripotence, Oct4, Nanog et Sox2, ont été examinés tout comme l'expression de gènes associés à la différenciation Cdx2 et EOMES. L'ARN des cellules eES-like a été purifié en utilisant le micro kit d'isolation d'ARN Quiagen (Quiagen, Mississauga, ON, Canada). Un traitement DNase 1 (Invitrogen) a été effectué pendant les protocoles de purification et de transcription inverse (RT). Les RT ont été effectuées en utilisant Superscript II (Invitrogen). Pour tous les échantillons, une RT négative consistant en une réaction RT sans l'enzyme transcriptase inverse a été utilisée comme contrôle. De plus, une réaction en chaîne par polymérase (PCR) sans ADN complémentaire a été utilisée comme contrôle négatif pour les PCR. Les amorces et les températures d'annihilation utilisées étaient : OCT4 : forward 5'- TCCCAGGACATCAAAGCT CTGCAGA-3'; reverse 5'- TCAGTTTGAATGCATG GGAGAAGCCCAGA -3'; Ta = 57°C; NANOG : forward 5'- GACAGCCCCGATTCATCCACCAG -3'; reverse 5'- GCACCAGGTCTGACTGTTCCAGG-3'; Ta = 57°C; Sox2 : forward 5'- GGCGGCAACCAGAAGAACAG -3'; reverse 5'-5'AGAAGAGGTAACCACGGG GG -3'; Ta = 57°C; GAPDH: forward 5'-GTCCATGCCATCACTGCCAC-3'; reverse 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'; Ta = 55°C; EOMES: forward 5'- CCACCGCCACCAAACACTGAGATG-3'; reverse 5'-CAGTATTAGGAGACTCTGG

GTGAA-3'; Ta = 57°C. Cdx2 : forward 5'-CAGCCAAGTGAAAACCAGGACGA-3'; reverse 5'-CCTCTCCTTTGCTCTGCGGTTC-3'; Ta = 57°C.

4.5 Analyses statistiques

Le test du Chi carré a été utilisé pour déterminer les différences statistiques entre les groupes expérimentaux. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du programme JMP (SAS Institute, Cary, NJ). Un niveau de probabilité de $p < 0.05$ était considéré significatif.

5.0 EXPOSÉ ET ANALYSE DES RÉSULTATS

5.1 Les conditions influençant la formation de colonies primaires et la production des lignées de cellules eES-like

5.1.1 Les cellules nourricières

La lignée MEF constitue une lignée de cellules nourricières connue depuis longtemps pour permettre la dérivation de cellules mES, pES et hES (Thomson et al., 1995, Thomson et al., 1998, Evans and Kaufman, 1981) et représente la lignée la plus couramment utilisée. Dans les rapports de dérivation de cellules eES-like, il a été démontré que les MEF, les bUCF et les fibroblastes fœtaux de cheval (hFF) soutiennent la croissance indifférenciée des cellules eES-like (Saito et al., 2002, Li et al., 2006). Cependant, l'efficacité de la dérivation des cellules eES-like en fonction des différentes lignées de cellules nourricières n'avait pas été comparée.

Dans notre étude, nous avons comparé l'efficacité des lignées de cellules nourricières MEF, bUCF et eUCF à soutenir l'explantation des ICM et la croissance des lignées de cellules eES-like jusqu'à P03. La lignée MEF a servi de référence puisqu'elle a été prouvée efficace pour dériver des cellules mES, pES et hES. Nous avons décidé d'inclure la lignée eUCF car ce type cellulaire est plus facile à dériver que les hFF, ce qui représente un avantage technique. Le Tableau 1 montre les taux de formation de colonies primaires et de production de lignées de cellules eES-like obtenus en fonction des lignées de cellules nourricières mitotiquement inactivées de MEF, eUCF et bUCF. Des taux élevés de formation de colonies primaires ont été

observés pour les lignées MEF (65%) et bUCF (59%). Comparativement, la lignée eUCF procure un taux de formation de colonies primaires inférieur (26%) ($p < 0,05$) (Tableau 1). Par ailleurs, l'utilisation de la lignée MEF tend à procurer un taux de production de lignées de cellules eES-like à P03 supérieur comparativement à la lignée eUCF ($p = 0,08$), tandis que qu'il ne semble pas y avoir de différence entre les lignées MEF et bUCF à ce niveau (Tableau 1). Ces résultats suggèrent que les MEF les bUCF représentent les lignées de cellules nourricières à privilégier pour dériver des lignées de cellules eES-like.

Tableau 1 : Influence de la lignée de cellules nourricières sur l'efficacité de la dérivation des cellules eES-like. ^{a, b}: Les valeurs avec différents exposants dans la même colonne sont significativement différentes.

Lignées de cellules nourricières	N ^{bre} d'ICM en culture	N ^{bre} de colonies primaires (%)	N ^{bre} de lignées de cellules eES à P03 (%)
MEF	20	13 (65) ^a	3 (15) ^a
EUCF	19	5 (26) ^b	0 (0) ^a
BUCF	17	10 (59) ^a	1 (6) ^a

Il n'est pas surprenant de constater que la lignée MEF soit efficace pour dériver des cellules eES-like. En effet, il a été démontré que les MEF soutiennent la croissance indifférenciées des cellules mES (Evans and Kaufman, 1981), des cellules pES (Thomson et al., 1995) et des cellules hES (Thomson et al., 1998). Cette lignée cellulaire est bien connue et couramment utilisée pour dériver les cellules mES. Par contre, il est curieux de remarquer que la lignée eUCF n'a pas permis de dériver des

lignées de cellules eES-like. Plus étonnant encore, la lignée bUCF, représentant le même type cellulaire que les eUCF mais chez une autre espèce, a permis la dérivation de cellules eES-like. Ce résultat est difficilement explicable car peu d'informations sont disponibles sur ce type cellulaire. Les faibles taux d'attachement des ICM et de production de lignées indiquent que la lignée eUCF ne constitue pas un substrat favorable à la culture des cellules eES-like. En présence de cette lignée de cellules nourricières, les cellules eES-like se différencient suite au premier passage. La production de lignée de cellules eES-like n'a donc pas pu être réalisée avec la lignée eUCF. Ce n'est cependant pas la première fois qu'une lignée de cellules nourricières se montre inefficace à la culture indifférenciée de cellules ES. Même certaines lignées MEF de différentes origines se sont montrées non-permissives à la dérivation de cellules ES (Greber et al., 2007). Une récente étude a suggéré que l'habileté d'une lignée de cellules nourricières à promouvoir la croissance indifférenciée des cellules ES est attribuable à sa production spécifique de facteurs de croissance (Eiselleova et al., 2008). Par ailleurs, comme il existe des différences interspécifiques au niveau du maintien de l'état pluripotent, une lignée de cellule nourricière permissive pour une espèce ne l'est pas forcément pour une autre. Dans le cas présent, la lignée MEF s'est avérée la plus efficace des trois lignées comparées pour dériver des cellules eES-like. Parce que cette lignée est bien connue pour soutenir la croissance de cellules ES chez d'autres espèces, nous avons décidé de procéder au reste de notre étude en utilisant la lignée MEF comme cellules nourricières.

5.1.2 Le stade de développement des embryons

Les taux de formation de colonies primaires et de production de lignées de cellules eES-like ont été comparés en fonction du stade de développement des blastocystes utilisés. Pour cette expérience, les MEF ont servi de cellules nourricières. Les résultats présentés dans le Tableau 2 montrent que le taux formation de colonies primaires à partir des JE (76%) n'est pas significativement supérieur à celui des VE (59%) ($p=0.11$). Cependant, les colonies primaires produites par l'utilisation des JE sont de forme aplaties et aux bordures distinctes, formées d'un seul type cellulaire possédant un ratio noyau-cytoplasme élevé et un nucléole proéminent (Figure 1A). Cette morphologie est semblable à celle rencontrée avec les cellules mES et hES (Evans and Kaufman, 1981, Thomson et al., 1998). Les colonies primaires produites par l'utilisation des VE sont, quant à elles, formées de deux types cellulaires de morphologie différente. Le premier type cellulaire, au centre de la colonie, est semblable à celui obtenu avec les JE. Le deuxième type cellulaire, en périphérie, est représenté par des cellules aplaties d'apparence différenciées et possédant un faible ratio noyau-cytoplasme (Figure 1B). Ces colonies primaires ont donc dû être disséquées pour sélectionner seulement le type cellulaire désiré lors du premier passage. Cependant, cette sélection n'est pas totalement efficace et des cellules différenciées peuvent être maintenues en culture avec les cellules eES-like produisant des lignées aux populations hétérogènes. Par conséquent, la production de lignées de cellules eES-like par les VE est diminuée. Par contre, la différence entre les taux de production de lignées de cellules eES-like par l'utilisation de JE par l'utilisation de VE n'est pas significative ($p>0,05$) (Tableau 2).

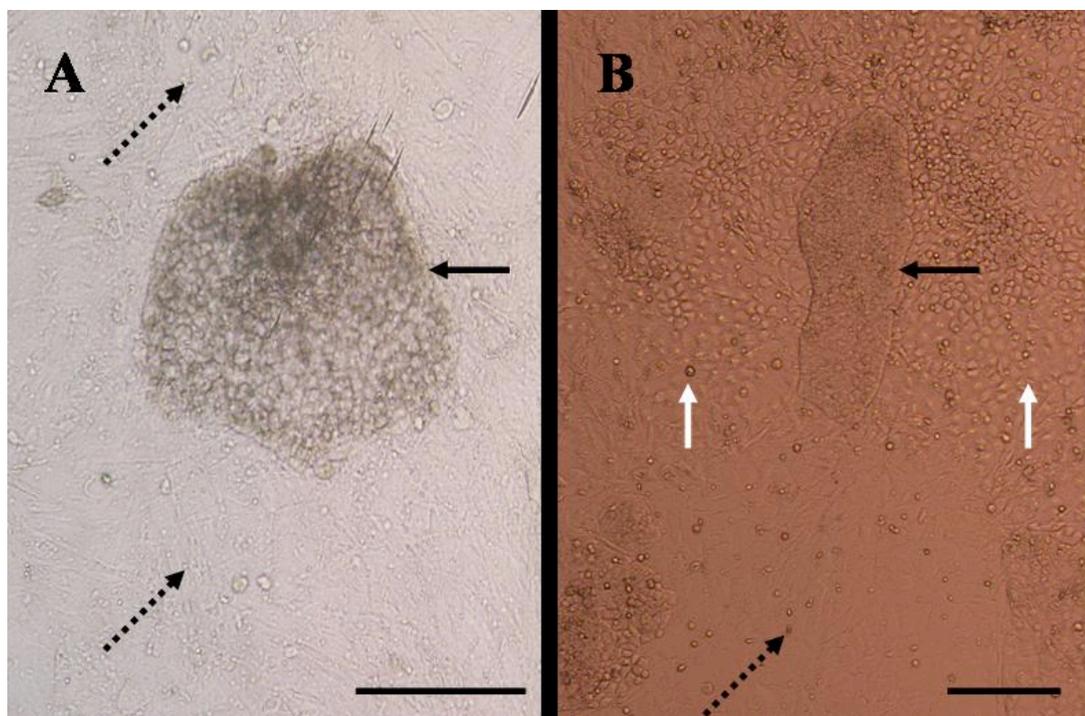


Figure 1 : Morphologie typique des colonies primaires de cellules eES-like. Apparence des colonies primaires formées par un JE (**A**) et par un VE (**B**). Notez la formation de colonies de cellules eES-like de forme aplaties et aux bordures distinctes (flèche noire), la formation de colonies de cellules différenciées (flèches blanches) et la présence d'une monocouche de MEF (flèche pointillée) Barre : 100 μm .

Tableau 2 : Influence du stade de développement des embryons sur l'efficacité de la dérivation des cellules eES-like. Aucune différence significative n'est observée entre les groupes au sein de la même colonne.

Stade de développement des embryons	N ^{bre} d'ICM en culture	N ^{bre} de colonies primaires (%)	N ^{bre} de lignées de cellules eES à P03 (%)
JE	33	25 (76)	5 (20)
VE	64	38 (59)	5 (8)

Malgré qu'il n'y ait pas de différence statistique entre les groupes, nos résultats démontrent qu'il est techniquement plus facile d'utiliser des JE pour dériver des lignées de cellules eES-like. Dans le but d'améliorer la technique de dérivation, nous considérons donc que les JE sont plus efficaces que les VE. Cette conclusion est cependant contradictoire avec certains rapports démontrant que le taux de formation des colonies primaires est supérieur en utilisant des blastocystes en éclosion comparativement à des jeunes blastocystes chez le buffle (*Bubalus bubalis*) (Verma et al., 2007, Huang et al., 2010). Selon ces études, le nombre plus élevé de cellules pluripotentes dans les embryons de stade plus âgé expliquerait leurs résultats.

Au cours de leur histoire, les cellules ES ont été dérivées à partir d'embryons pré implantation de différents stades de développement. La production de lignées de cellules ES a été démontrée autant à partir de blastomères d'embryons au stade 2-cellules (Wakayama et al., 2007) que par l'ICM d'embryons au stade blastocyste (Evans and Kaufman, 1981, Thomson et al., 1998). Chaque stade de développement procure des avantages et des inconvénients. Le stade blastocyste a probablement été celui le plus utilisé toutes espèces confondues. Chez les équins, l'embryologie est particulière. À partir du 6^e jour suivant l'ovulation, l'embryon équin au stade blastocyste commence à s'envelopper d'une capsule épaisse et élastique, moulée à la ZP (Bousquet et al., 1987). Elle est composée de mucoglycoprotéines sécrétées par les cellules du TE et a pour fonction de limiter le développement de l'embryon en empêchant son éclosion. Cette capsule est aussi présente pour les embryons équins produits in vitro mais elle est moins efficace (Tremoleda et al., 2003). Dans notre

étude, les embryons utilisés pour isoler les ICM présentaient plusieurs différences morphologiques. Plus précisément, les JE possédaient une ICM non apparente, un TE composé de cellules non compactes et ils étaient dépourvus d'une capsule (Figure 2A). Contrairement, les embryons du groupe VE possédaient une ICM apparente, un TE composé de cellules compactes et une capsule bien développée (Figure 2B).

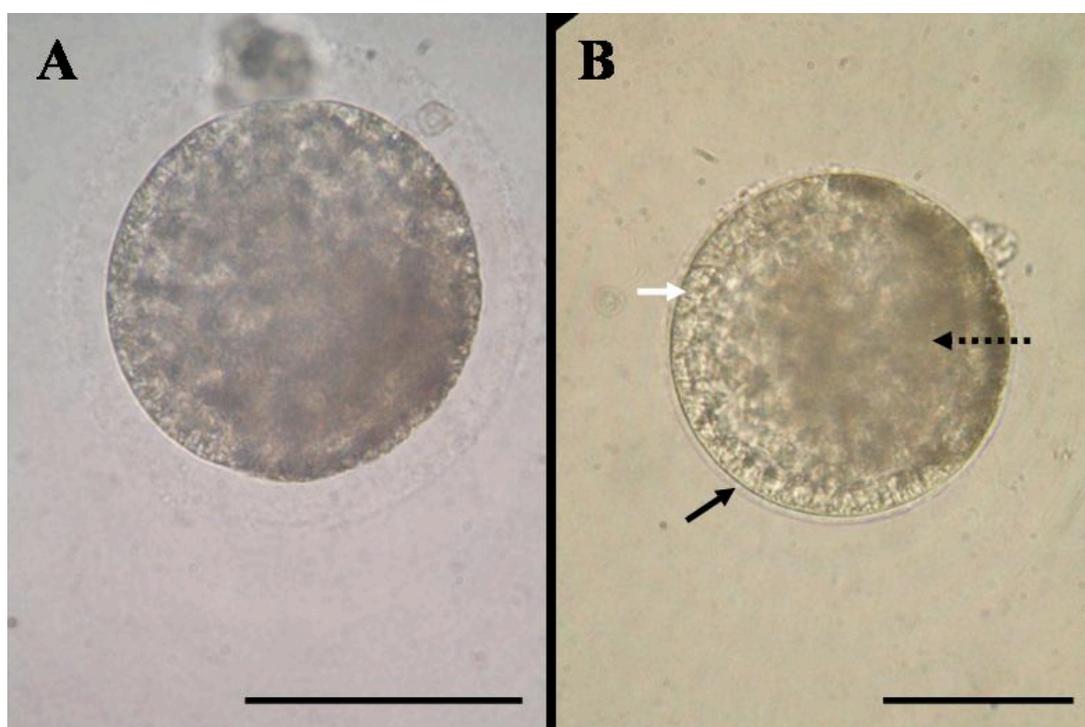


Figure 2 : Morphologie typique des embryons équins parthénogénétiques. Apparence d'un JE (A) et d'un VE (B). Notez la présence de la capsule (flèche noire), de cellules du TE compactes (flèche blanche) et d'une ICM apparente (flèche pointillée) chez le VE. Barre : 100 μ m.

Ces différences morphologiques avaient un impact direct sur l'efficacité de la technique d'isolation des ICM. La digestion enzymatique de la ZP, la capsule et du

TE des VE était peu efficace, de sorte que, même si leur ICM était bien visible, il était difficile de l'isoler complètement des cellules du TE. Pour cette raison, les colonies primaires formées à partir de ces ICM peuvent avoir été contaminées par des cellules résiduelles du TE, expliquant pourquoi les colonies primaires étaient formées de deux types cellulaires. Par ailleurs, une autre explication est envisageable. Au début du stade blastocyste, l'embryon est constitué de deux lignées cellulaires : le TE et l'ICM (Tremoleda et al., 2003). À ce stade, l'ICM est constituée d'une population homogène de cellules pluripotentes, ce qui expliquerait pourquoi les colonies primaires formées par les JE étaient composées d'un seul type cellulaire. À un stade blastocyste plus avancé, l'ICM subit sa première ségrégation pour former l'hypoblaste, produisant l'endoderme extraembryonnaire, et l'épiblaste, produisant les trois feuillets germinatifs (Rossant, 2001). Les résultats obtenus avec l'utilisation des VE suggèrent que l'ICM de ces embryons aurait subi la première ségrégation, ce qui expliquerait la formation de colonies primaires constituées de deux types cellulaires. Suite à ces résultats, il aurait été intéressant d'utiliser des embryons à des stades de développement morula ou précompaction pour en évaluer leur efficacité de dérivation de cellules eES-like.

5.1.3 L'inhibition de voies de signalisation

Le milieu de culture généralement utilisé pour tenter de dériver des cellules ES chez des espèces non-permissives est celui utilisé pour dériver des cellules mES. L'élément le plus important dans ce milieu pour la dérivation des cellules mES est le LIF. Cependant, pour les cellules eES, il n'est toujours pas clair si le LIF est

essentiel ou non à la culture indifférenciée de ces cellules. Les deux rapports de dérivation de cellules eES-like sont contradictoire à cet égard (Li et al., 2006, Saito et al., 2002). Par ailleurs, comme des cellules eES-like ont pu être dérivées en présence de LIF, sa présence ne semble pas être néfaste. Nous avons donc décidé d'utiliser le LIF dans notre milieu culture au cas où sa présence pourrait être bénéfique. L'inhibition de voies de signalisation menant à la différenciation est la technique qui a permis de dériver des cellules rES (Buehr et al., 2008). Nous avons appliqué cette même stratégie dans le but de dériver des cellules eES. De façon précise, l'inhibition des voies de signalisation MAPK, Wnt et TGF β a été effectuée respectivement par les composés chimiques PD032591, CHIR99021 et A83-01 faisant partie du ESM+3i. Les ESM et ESM+3i ont été comparés pour les taux de formation de colonies primaires et de production de lignées de cellules eES-like. Lors de cette expérience, les MEF ont servi de cellules nourricières et les JE ont servi pour la procédure d'explantation des ICM. Le taux de formation de colonies primaires obtenu avec le ESM est semblable à celui obtenu avec le ESM+3i ($p>0,05$) (Tableau 3) De plus, pour les deux groupes, les colonies primaires formées sont aplaties et aux bordures distinctes et constituées de cellules compactes, possédant un ratio noyau-cytoplasme élevé et d'un nucléole proéminent. Cette morphologie des cellules eES-like est similaire à celle des cellules mES et hES (Evans and Kaufman, 1981, Thomson et al., 1998). Pareillement, il n'y a pas d'effet notable sur le taux de production de lignées de cellules eES-like par l'utilisation de ESM en comparaison avec ESM+3i ($p>0,05$) (Tableau 3). Les résultats obtenus suggèrent que l'inhibition

des voies de signalisation MAPK, Wnt et TGF β n'améliore pas l'efficacité de la dérivation des cellules eES-like jusqu'à P03.

Tableau 3 : Influence de l'inhibition des voies de signalisation des MAPK, Wnt et TGF β sur l'efficacité de la dérivation des cellules eES-like. Aucune différence significative n'est observée entre les groupes au sein de la même colonne.

Milieu de culture	N ^{bre} d'ICM en culture	N ^{bre} de colonies primaires (%)	N ^{bre} de lignées de cellules eES à P03 (%)
ESM	22	15 (68)	3 (14)
ESM+3i	23	15 (65)	3 (13)

L'utilisation du ESM+3i n'a pas permis d'observer des différences au niveau des taux de formation de colonies primaires et de production de lignées de cellules eES-like à P03. Cependant, son utilisation aurait pu avoir un impact sur la longévité des cultures de cellules eES-like. En effet, sur un nombre plus élevé de passages, le ESM+3i aurait pu avoir des effets bénéfiques en protégeant les cellules eES-like de signaux induisant la différenciation. Ces effets auraient pu être démontrés par le maintien en culture sur un plus grand nombre de passages des cellules eES-like en présence du ESM+3i comparativement au ESM. Une étude à plus long terme sur la culture des cellules eES-like aurait donc dû être conduite en ce sens. Toutefois, les effets du ESM+3i sur les cellules eES-like n'étaient pas simplement espérés au niveau de l'efficacité de la technique de dérivation. En fait, l'action des inhibiteurs est soupçonnée de se manifester aussi au niveau moléculaire, sur les gènes associés à la pluripotence et à la différenciation.

5.2 La caractérisation des lignées de cellules eES

Les rapports de dérivation des cellules eES-like rapportés dans la littérature présentent une caractérisation moléculaire limitée des ces cellules. Notre étude avait pour deuxième objectif d'approfondir la caractérisation des cellules eES-like, ce qui donnait par le fait même suite à la comparaison des ESM et ESM+3i. Une caractérisation moléculaire approfondie a été effectuée sur les lignées de cellules eES-like produites à P03 par ces deux milieux. D'abord, les résultats du marquage pour l'AP démontrent que cette enzyme est exprimée par les lignées de cellules eES-like produites en présence du ESM (Figure 3A) et du ESM+3i (Figure 3B).

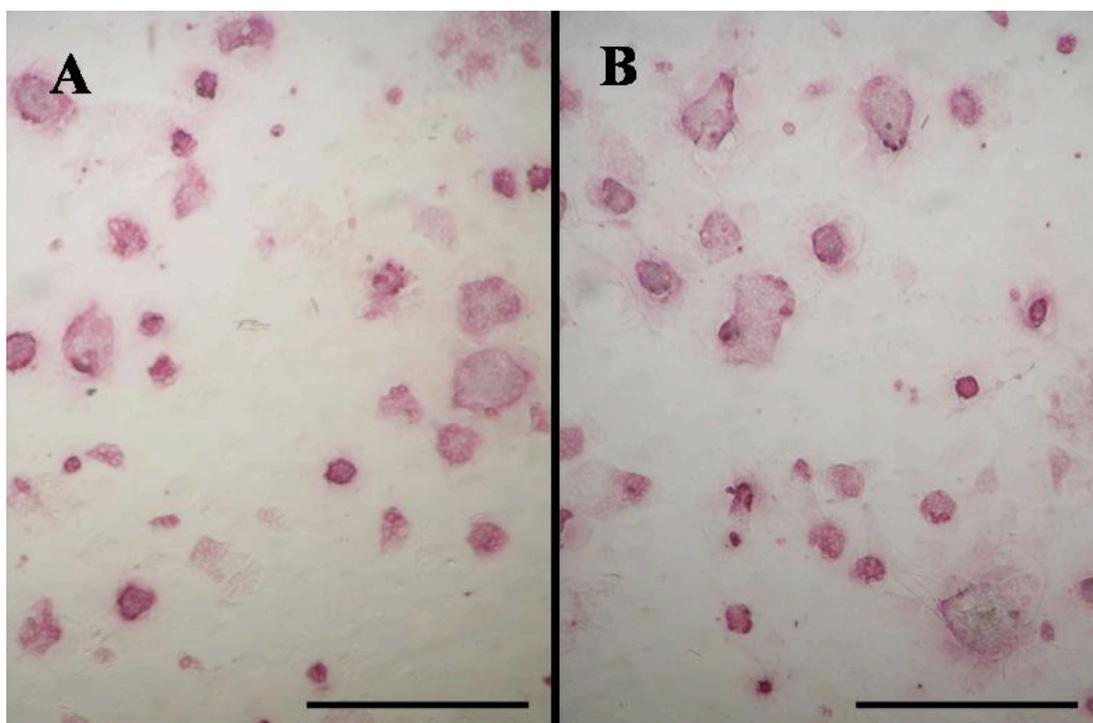


Figure 3 : Marquage pour l'activité alcaline phosphatase (AP) des lignées de cellules eES-like produites à P03 par le ESM (A) et le ESM+3i (B). Barre : 100 μ m.

Ensuite, l'expression de gènes associés à la pluripotence et à la différenciation a été vérifiée. Selon notre hypothèse, le ESM+3i devait favoriser l'expression des gènes associés à la pluripotence, Oct4, Nanog et Sox2, et réprimer l'expression de gènes associés à la différenciation, Cdx2 et EOMES. Cependant, les résultats des analyses par RT-PCR n'ont pas identifié de différences entre les patrons d'expression de ces gènes. Pour les lignées produites en présence des deux milieux de culture, Oct4, Sox2 et Nanog ainsi que Cdx2 et EOMES sont exprimés (Figure 4).

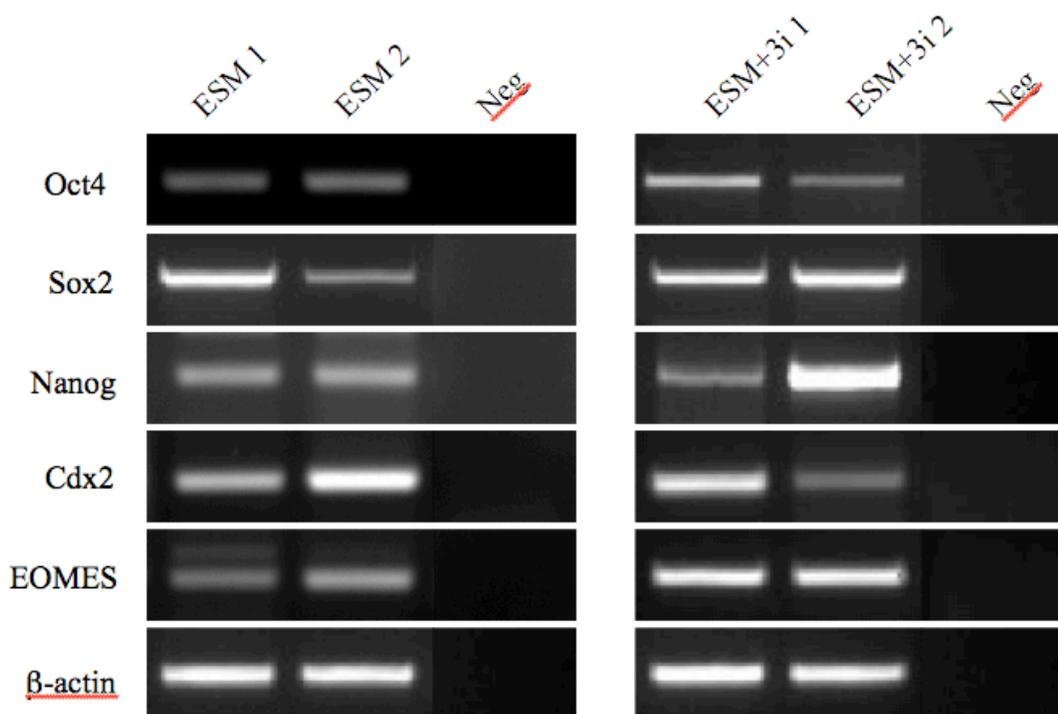


Figure 4 : Analyse par RT-PCR de marqueurs associés à la pluripotence et à la différenciation des cellules eES-like. Les gènes Oct4, Sox2, Nanog, Cdx2 et EOMES ont été analysés pour deux lignées de cellules eES-like en présence du ESM (ESM 1 et ESM 2) et du ESM+3i (ESM+3i 1 et ESM+3i 2).

Conformément aux résultats de caractérisation antérieure, Oct4 est exprimé au niveau de l'ARN pour nos lignées de cellules eES-like (Li et al., 2006, Saito et al., 2002). À Oct4, nous ajoutons aussi l'expression des gènes Sox2 et Nanog qui sont détectés dans nos populations de cellules eES-like mais qui n'avaient pas été rapportés par les études antérieures (Saito et al., 2002, Li et al., 2006). L'expression de ces trois gènes associés à la pluripotence, aussi détectée chez les cellules mES et hES, suggère que les cellules obtenues sont des cellules eES pluripotentes. Cependant, l'expression des gènes Cdx2 et EOMES, associés à la différenciation au TE (Niwa et al., 2001), a elle aussi été détectée. Ce résultat pourrait être la conséquence de la dérivation de lignées hétérogènes provoquée par l'enlèvement incomplet des tissus extraembryonnaires au moment de l'explantation ou par la différenciation spontanée des cellules eES en TE. Si tel est le cas, ce résultat suggérerait la présence de cellules eES pluripotentes et de cellules de lignées TE dans les cultures. La technique de dérivation et les conditions de culture seraient donc encore à améliorer pour obtenir une population homogène de cellules eES. D'un autre côté, l'explantation et la propagation des cellules de l'ICM d'embryons équins pourraient conduire à la dérivation in vitro d'une population de cellules homogène représentant un type cellulaire unique sans équivalent in vivo. En effet, aucune différence morphologique ne semble démontrer la présence d'une population hétérogène de cellules. D'autres travaux sont requis pour faire la lumière sur ce sujet.

6.0 DISCUSSION GÉNÉRALE

La technique de dérivation des cellules ES est une procédure complexe où toutes les étapes sont décisives et interdépendantes. Un seul faux-pas provoque une différenciation cellulaire irréversible, entraînant la sortie de l'état pluripotent. La pluripotence représente la principale propriété des cellules ES et derrière elle se cachent plusieurs notions théoriques fondamentales encore inconnues. Il est donc d'un intérêt particulier d'ajouter des connaissances sur les processus spécifiques associés à la pluripotence et sur l'identification de marqueurs qui lui en sont caractéristique. Notre étude sur les cellules eES, comme celles rapportées dans la littérature, démontrent que beaucoup de chemin reste à faire en ce sens. Lorsque les conditions permettant de dériver des cellules ES pluripotentes chez le cheval seront identifiés, un pas en avant sera effectué pour appliquer la thérapie cellulaire par cellules ES chez cette espèce.

Dans notre étude, nous avons tenté différentes stratégies dans le but d'améliorer la technique de dérivation des cellules eES. Nous avons démontré la dérivation de cellules eES-like à partir d'embryons parthénogénétiques au stade blastocyste. Les essais antérieurs avaient quant à eux utilisé des embryons d'origine in vivo (Li et al., 2006). Dans le but de produire des cellules ES autologues, l'idéal aurait été de travailler avec des embryons produits par SCNT. Cependant, ces embryons sont difficiles à produire, ce qui limite leur disponibilité. À l'inverse, les embryons équins parthénogénétiques peuvent être produits relativement facilement. De plus, ces embryons sont morphologiquement semblables aux embryons SCNT, reflétant plus

fidèlement les conditions des embryons SCNT comparativement aux embryons in vivo. Dans les rapports de dérivation de cellules eES-like, l'ICM des embryons in vivo a été isolée soit par immunochirurgie (Li et al., 2006) ou par microchirurgie (Saito et al., 2002). Chez les embryons parthénogénétiques, le TE est souvent fragmenté et non hermétique. Il a été démontré chez des embryons de lapin parthénogénétiques ou SCNT que l'immunochirurgie provoque la destruction de l'ICM et du TE par la réaction du complément avec l'anticorps (Wang et al., 2007). La technique d'immunochirurgie est donc moins appropriée pour isoler l'ICM d'embryons parthénogénétiques. Par ailleurs, la microchirurgie est une technique longue et ne permet pas d'enlever tous les tissus extraembryonnaires. Dans notre étude, nous avons choisi d'isoler les ICM des embryons parthénogénétiques par la méthode enzymatique de digestion à la pronase. Cette méthode permet de digérer rapidement la ZP, la capsule et le TE. De plus, comparativement à la méthode de microchirurgie, plusieurs embryons pouvaient être utilisés par manipulation.

Malgré que les embryons parthénogénétiques, tout comme les embryons SCNT, présentent fréquemment des anomalies au niveau de l'expression de gènes imprégnés paternels (Maher, 2005), il a été démontré que ces embryons sont propices à la dérivation de cellules ES (Wakayama et al., 2006, Brambrink et al., 2006). Par ailleurs, des études chez la souris suggèrent que les lignées de cellules ES produites à partir d'embryons parthénogénétiques possèdent le même potentiel de différenciation que celui des lignées de cellules ES produites à partir d'embryons in vivo (Kim et al., 2007, Allen et al., 1994, Brevini and Gandolfi, 2008). Par conséquent, les lignées de

cellules eES produites par embryons parthénogénétiques pourraient servir à expérimenter la thérapie cellulaire. Au cours de notre étude, les embryons parthénogénétiques utilisés ont donné un taux de formation de colonies primaires d'environ 70%, signifiant que les possibles anomalies génétiques de ces embryons n'ont pas d'effet négatif sur l'explantation des ICM.

Nos travaux ont aussi mis l'accent sur l'efficacité de différentes lignées de cellules nourricières à dériver des cellules eES-like. Il est considéré que les cellules nourricières jouent un double rôle dans le maintien de l'état pluripotent. Elles supportent l'attachement des cellules ES par l'expression de molécules d'adhésion et elles favorisent la survie et la croissance des cellules ES par la production de facteurs de croissance (Greber et al., 2007, Eiselleova et al., 2008, Saxena et al., 2008). Cependant, les mécanismes à l'origine de ces deux rôles ne sont pas encore clairement définis. La méthode d'essais et erreurs a en quelque sorte servi à déterminer quelles lignées de cellules nourricières soutiennent ou ne soutiennent pas la croissance des cellules ES dans un état indifférencié. Par ailleurs, l'utilisation de cellules nourricières autologues représente un avantage important pour utiliser les cellules ES en thérapie cellulaire. Principalement, les cellules nourricières autologues sécrètent des hormones et des facteurs de croissance spécifique, préviennent la contamination par des cellules d'une autre espèce et la transmission de maladies (Eiselleova et al., 2008). Dans notre étude, bien que les eUCF possèdent tous les avantages des cellules nourricières autologues, nos résultats démontrent que ce type cellulaire ne supporte pas la croissance des cellules eES-like. Une autre lignée de

cellules nourricières autologues devra être utilisée pour éventuellement permettre l'application des cellules eES en médecine régénérative. Dans le but ultime d'être utilisées en thérapie cellulaire, les cellules ES devraient idéalement être cultivées en absence de cellules nourricières et de tous facteurs exogènes. Cependant, les lignées de cellules eES-like dérivées jusqu'à maintenant sont dépendantes de la présence des cellules nourricières (Li et al., 2006, Saito et al., 2002).

Dans nos travaux, l'inhibition de voies de signalisation menant à la différenciation a été testée. L'utilisation du ESM+3i n'a pas influencée l'efficacité de la dérivation des cellules eES-like comparativement au ESM conventionnel. De plus, le ESM+3i n'a pas influencé l'expression de marqueurs associés à la pluripotence et à la différenciation. Toutefois, l'expression de ces marqueurs a seulement été évaluée au niveau de l'ARN. Une étude complémentaire par histochimie est requise pour confirmer ces résultats au niveau protéique. Par ailleurs, l'utilisation de la technique de PCR quantitatives aurait permis de quantifier l'expression des gènes associés à la pluripotence et à la différenciation. De cette façon, des différences entre l'utilisation du ESM et du ESM+3i auraient pu être identifiées.

La caractérisation des lignées de cellules eES-like dérivées nous a permis de démontrer que ces cellules expriment des marqueurs associés à la pluripotence en même temps que des marqueurs associés à la différenciation. Nous avons confirmé la dérivation de lignées de cellules eES-like positives pour AP et Oct4, tout comme les précédents rapports, mais aussi pour Sox2 et Nanog, ce qui n'avait pas été démontré

jusqu'à présent. Cependant, ces lignées expriment aussi les marqueurs Cdx2 et EOMES associés à des lignées du TE. Ce résultat peut être expliqué par la dérivation de deux populations de cellules au sein de la même lignée de cellules eES-like, l'une pluripotente et l'autre différenciée. Si cette hypothèse s'avère juste, la formation de tératomes pourrait être produite par la population de cellules pluripotentes. Cependant, nous n'avons pas pu tester cette possibilité. Il aurait été intéressant de savoir si le groupe de Li et ses collègues ont pu identifier eux aussi les marqueurs Cdx2 et EOMES dans leur lignées de cellules eES-like (Li et al., 2006). Dans l'éventualité de ce cas, l'absence de formation de tératome rapportée par ce groupe pourrait être expliquée par la dérivation de lignées de cellules eES-like homogènes mais au phénotype unique, exprimant autant des marqueurs associés à la pluripotence qu'à la différenciation. Nos résultats, tout comme ceux des études antérieures, démontrent que d'autres connaissances sur les processus impliqués dans le maintien de l'état pluripotent les cellules eES sont nécessaires. D'autres travaux sont donc nécessaires pour prouver la dérivation d'authentiques cellules eES.

7.0 CONCLUSIONS

7.1 Amélioration de la technique de dérivation des cellules eES-like

Lors de notre étude, nous avons démontré que l'efficacité de la dérivation des cellules eES-like est influencée par la lignée de cellules nourricières et par le stade de développement des embryons utilisés. La technique utilisée offrant la meilleure efficacité de dérivation des cellules eES-like utilisait la lignée de cellules nourricière MEF et les JE. Par ailleurs, aucun effet de l'inhibition de voies de signalisation menant à la différenciation n'a été démontré sur la dérivation des cellules eES-like. Une étude à long terme est requise pour évaluer de façon plus précise l'impact du milieu ESM+3i sur le maintien des cellules eES-like en culture.

7.1 Caractérisation des lignées de cellules eES-like

Dans notre étude, nous avons démontré la dérivation de lignées de cellules eES-like possédant des caractéristiques des cellules pluripotentes mais aussi des cellules différenciées. Nos lignées de cellules eES-like expriment les marqueurs associés à la pluripotence AP, Oct4 Sox2 et Nanog, tout comme les marqueurs Cdx2 et EOMES associés à la différenciation en lignées du TE. Par ailleurs, l'inhibition de voies de signalisation menant à la différenciation n'affecte pas l'expression de ces marqueurs. D'autres études sont nécessaires pour identifier la nature des cellules eES-like et pour éventuellement dériver d'authentiques cellules eES pouvant être utilisées en thérapie cellulaire.

8.0 BIBLIOGRAPHIE

- AIGNER, T. & MCKENNA L. 2002. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci*, 59, 5-18.
- ALLEN, N. D., BARTON, S. C., HILTON, K., NORRIS, M. L. & SURANI, M. A. 1994. A functional analysis of imprinting in parthenogenetic embryonic stem cells. *Development*, 120, 1473-82.
- AUERBACH, W., DUNMORE, J. H., FAIRCHILD-HUNTRESS, V., FANG, Q., AUERBACH, A. B., HUSZAR, D. & JOYNER, A. L. 2000. Establishment and chimera analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-derived mouse embryonic stem cell lines. *Biotechniques*, 29, 1024-8, 1030, 1032.
- AVILION, A. A., NICOLIS, S. K., PEVNY, L. H., PEREZ, L., VIVIAN, N. & LOVELL-BADGE, R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 17, 126-40.
- BAIN, J., PLATER, L., ELLIOTT, M., SHPIRO, N., HASTIE, C. J., MCLAUCHLAN, H., KLEVERNIC, I., ARTHUR, J. S., ALESSI, D. R. & COHEN, P. 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J*, 408, 297-315.
- BARRY, F. P. 2003. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 69, 250-6.
- BOER, B., KOPP, J., MALLANNA, S., DESLER, M., CHAKRAVARTHY, H., WILDER, P. J., BERNADT, C. & RIZZINO, A. 2007. Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2:Oct-3/4 target genes. *Nucleic Acids Res*, 35, 1773-86.

- BOIANI, M. & SCHOLER, H. R. 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 872-84.
- BOUSQUET, D., GUILLOMOT, M. & BETTERIDGE, K. J. 1987. Equine zona pellucida and capsule: some physicochemical and antigenic properties. *Gamete Res*, 16, 121-32.
- BOYER, L. A., LEE, T. I., COLE, M. F., JOHNSTONE, S. E., LEVINE, S. S., ZUCKER, J. P., GUENTHER, M. G., KUMAR, R. M., MURRAY, H. L., JENNER, R. G., GIFFORD, D. K., MELTON, D. A., JAENISCH, R. & YOUNG, R. A. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122, 947-56.
- BRAMBRINK, T., HOCHEDLINGER, K., BELL, G. & JAENISCH, R. 2006. ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 933-8.
- BREVINI, T. A. & GANDOLFI, F. 2008. Parthenotes as a source of embryonic stem cells. *Cell Prolif*, 41 Suppl 1, 20-30.
- BRIGNIER, A. C. & GEWIRTZ, A. M. 2010. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol*, 125, S336-44.
- BUEHR, M., MEEK, S., BLAIR, K., YANG, J., URE, J., SILVA, J., MCLAY, R., HALL, J., YING, Q. L. & SMITH, A. 2008. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*, 135, 1287-98.
- BUEHR, M. & SMITH, A. 2003. Genesis of embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358, 1397-402; discussion 1402.

- BURDON, T., SMITH, A. & SAVATIER, P. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol*, 12, 432-8.
- CAO, S., WANG, F., CHEN, Z., LIU, Z., MEI, C., WU, H., HUANG, J., LI, C., ZHOU, L. & LIU, L. 2009. Isolation and culture of primary bovine embryonic stem cell colonies by a novel method. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, 311, 368-76.
- CHAMBERS, I., COLBY, D., ROBERTSON, M., NICHOLS, J., LEE, S., TWEEDIE, S. & SMITH, A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113, 643-55.
- CHAMBERS, I., SILVA, J., COLBY, D., NICHOLS, J., NIJMEIJER, B., ROBERTSON, M., VRANA, J., JONES, K., GROTEWOLD, L. & SMITH, A. 2007. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, 450, 1230-4.
- CHAMBERS, I. & TOMLINSON, S. R. 2009. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development*, 136, 2311-22.
- DAMJANOV, I. & ANDREWS, P. W. 2007. The terminology of teratocarcinomas and teratomas. *Nat Biotechnol*, 25, 1212; discussion 1212.
- DOETSCHMAN, T. C., EISTETTER, H., KATZ, M., SCHMIDT, W. & KEMLER, R. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*, 87, 27-45.

- EGGAN, K. & JAENISCH, R. 2003. Differentiation of F1 embryonic stem cells into viable male and female mice by tetraploid embryo complementation. *Methods Enzymol*, 365, 25-39.
- EISELLEOVA, L., PETERKOVA, I., NERADIL, J., SLANINOVA, I., HAMPL, A. & DVORAK, P. 2008. Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int J Dev Biol*, 52, 353-63.
- EVANS, M. J. & KAUFMAN, M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-6.
- FRISBIE, D. D., CROSS, M. W. & MCILWRAITH, C. W. 2006. A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 19, 142-46.
- FRISBIE, D. D., KISIDAY, J. D., KAWCAK, C. E., WERPYP, N. M. & MCILWRAITH, C. W. 2009. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *J Orthop Res*, 27, 1675-80.
- FRISBIE, D. D. & MCILWRAITH, C. W. 2000. Evaluation of gene therapy as a treatment for equine traumatic arthritis and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*, S273-87.
- GEENS, M., MATEIZEL, I., SERMON, K., DE RYCKE, M., SPITS, C., CAUFFMAN, G., DEVROEY, P., TOURNAYE, H., LIEBAERS, I. & VAN DE VELDE, H. 2009. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos. *Hum Reprod*, 24, 2709-17.

- GERECHT-NIR, S. & ITSKOVITZ-ELDOR, J. 2004. The promise of human embryonic stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 18, 843-52.
- GOLDRING, M. B. & GOLDRING S. R. 2007. Osteoarthritis. *J Cell Physiol*, 213, 626-34.
- GOMEZ, M. C., SERRANO, M. A., POPE, C. E., JENKINS, J. A., BIANCARDI, M. N., LOPEZ, M., DUMAS, C., GALIGUIS, J. & DRESSER, B. L. 2010. Derivation of cat embryonic stem-like cells from in vitro-produced blastocysts on homologous and heterologous feeder cells. *Theriogenology*, 74, 498-515.
- GREBER, B., LEHRACH, H. & ADJAYE, J. 2007. Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells*, 25, 455-64.
- GURDON, J.B. & COLMAN, A. 1999. The future of cloning, *Nature*, 402, 743-46.
- HAO, J., LI, T. G., QI, X., ZHAO, D. F. & ZHAO, G. Q. 2006. WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*, 290, 81-91.
- HAYES, B., FAGERLIE, S. R., RAMAKRISHNAN, A., BARAN, S., HARKEY, M., GRAF, L., BAR, M., BENDORAITE, A., TEWARI, M. & TOROK-STORB, B. 2008. Derivation, characterization, and in vitro differentiation of canine embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26, 465-73.

- HUANG, B., LI, T., WANG, X. L., XIE, T. S., LU, Y. Q., DA SILVA, F. M. & SHI, D. S. 2010. Generation and characterization of embryonic stem-like cell lines derived from in vitro fertilization Buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Reprod Domest Anim*, 45, 122-8.
- HUMPHREY, R. K., BEATTIE, G. M., LOPEZ, A. D., BUCAY, N., KING, C. C., FIRPO, M. T., ROSE-JOHN, S. & HAYEK, A. 2004. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells*, 22, 522-30.
- KEEFER, C. L., PANT, D., BLOMBERG, L. & TALBOT, N. C. 2007. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Anim Reprod Sci*, 98, 147-68.
- KELLER, G. 2005. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev*, 19, 1129-55.
- KELLNER, S. & KIKYO, N. 2010. Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histol Histopathol*, 25, 405-12.
- KIM, K., LEROU, P., YABUUCHI, A., LENGGERKE, C., NG, K., WEST, J., KIRBY, A., DALY, M. J. & DALEY, G. Q. 2007. Histocompatible embryonic stem cells by parthenogenesis. *Science*, 315, 482-6.
- KOCH, T. G. & BETTS, D. H. 2007. Stem cell therapy for joint problems using the horse as a clinically relevant animal model. *Expert Opin Biol Ther*, 7, 1621-6.

- KOLCH, W. 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, 351 Pt 2, 289-305.
- KOPP, J. L., ORMSBEE, B. D., DESLER, M. & RIZZINO, A. 2008. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26, 903-11.
- KOPP, J. L., ORMSBEE, B. D., DESLER, M. & RIZZINO, A. 2008. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26, 903-11.
- LAWRENCE, R. C., FELSON, D. T. HELMICK, C. G., ARNOLD, L. M., CHOI, H., DEYO, RR. A., GABRIEL, S., HIRSCH, R., HOCHBERG, M. C., HUNDER, G. G., JORDAN, J. M., KATZ, J. N., KREMERS, H. M. & WOLFE, F. 2008. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum*, 58, 26-35.
- LI, X., ZHOU, S. G., IMREH, M. P., AHRLUND-RICHTER, L. & ALLEN, W. R. 2006. Horse embryonic stem cell lines from the proliferation of inner cell mass cells. *Stem Cells Dev*, 15, 523-31.
- LOH, Y. H., WU, Q., CHEW, J. L., VEGA, V. B., ZHANG, W., CHEN, X., BOURQUE, G., GEORGE, J., LEONG, B., LIU, J., WONG, K. Y., SUNG, K. W., LEE, C. W., ZHAO, X. D., CHIU, K. P., LIPOVICH, L., KUZNETSOV, V. A., ROBSON, P., STANTON, L. W., WEI, C. L., RUAN, Y., LIM, B. & NG, H. H. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network

regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*, 38, 431-40.

LORTHONGPANICH, C., YANG, S. H., PIOTROWSKA-NITSCHKE, K., PARNPAI, R. & CHAN, A. W. 2008. Development of single mouse blastomeres into blastocysts, outgrowths and the establishment of embryonic stem cells. *Reproduction*, 135, 805-13.

MAHER, E. R. 2005. Imprinting and assisted reproductive technology. *Hum Mol Genet*, 14 Spec No 1, R133-8.

MARTIN, G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 7634-8.

MARTIN, G. R. & EVANS, M. J. 1975. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 1441-5.

MASUI, S., NAKATAKE, Y., TOYOOKA, Y., SHIMOSATO, D., YAGI, R., TAKAHASHI, K., OKOCHI, H., OKUDA, A., MATOBA, R., SHAROV, A. A., KO, M. S. & NIWA, H. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 9, 625-35.

MATSUDA, T., NAKAMURA, T., NAKAO, K., ARAI, T., KATSUKI, M., HEIKE, T. & YOKOTA, T. 1999. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*, 18, 4261-9.

- MITSUI, K., TOKUZAWA, Y., ITOH, H., SEGAWA, K., MURAKAMI, M., TAKAHASHI, K., MARUYAMA, M., MAEDA, M. & YAMANAKA, S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113, 631-42.
- MUIR, H. 1995. The condrocyte, architect of cartilage. *BioEssays*, 17, 1039-48.
- MUNOZ, M., TRIGAL, B., MOLINA, I., DIEZ, C., CAAMANO, J. N. & GOMEZ, E. 2009. Constraints to progress in embryonic stem cells from domestic species. *Stem Cell Rev*, 5, 6-9.
- NAGY, A., ROSSANT, J., NAGY, R., ABRAMOW-NEWERLY, W. & RODER, J. C. 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8424-8.
- NICHOLS, J., SILVA, J., ROODE, M. & SMITH, A. 2009. Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development*, 136, 3215-22.
- NICHOLS, J., ZEVNIK, B., ANASTASSIADIS, K., NIWA, H., KLEWENEBENIUS, D., CHAMBERS, I., SCHOLER, H. & SMITH, A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95, 379-91.
- NIWA, H. 2001. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct*, 26, 137-48.
- NIWA, H., BURDON, T., CHAMBERS, I. & SMITH, A. 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, 12, 2048-60.

- NIWA, H., OGAWA, K., SHIMOSATO, D. & ADACHI, K. 2009. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 460, 118-22.
- NIWA, H., TOYOOKA, Y., SHIMOSATO, D., STRUMPF, D., TAKAHASHI, K., YAGI, R. & ROSSANT, J. 2005. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*, 123, 917-29.
- O'CONNOR, M. D., KARDEL, M. D., IOSFINA, I., YOUSSEF, D., LU, M., LI, M. M., VERCAUTEREN, S., NAGY, A. & EAVES, C. J. 2008. Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26, 1109-16.
- OGAWA, K., SAITO, A., MATSUI, H., SUZUKI, H., OHTSUKA, S., SHIMOSATO, D., MORISHITA, Y., WATABE, T., NIWA, H. & MIYAZONO, K. 2007. Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 120, 55-65.
- OKUMURA-NAKANISHI, S., SAITO, M., NIWA, H. & ISHIKAWA, F. 2005. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 280, 5307-17.
- OUHIBI, N., SULLIVAN, N. F., ENGLISH, J., COLLEDGE, W. H., EVANS, M. J. & CLARKE, N. J. 1995. Initial culture behaviour of rat blastocysts on selected feeder cell lines. *Mol Reprod Dev*, 40, 311-24.

- PALMQVIST, L., GLOVER, C. H., HSU, L., LU, M., BOSSEN, B., PIRET, J. M., HUMPHRIES, R. K. & HELGASON, C. D. 2005. Correlation of murine embryonic stem cell gene expression profiles with functional measures of pluripotency. *Stem Cells*, 23, 663-80.
- PAN, G. J., CHANG, Z. Y., SCHOLER, H. R. & PEI, D. 2002. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res*, 12, 321-9.
- PEASE, S., BRAGHETTA, P., GEARING, D., GRAIL, D. & WILLIAMS, R. L. 1990. Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol*, 141, 344-52.
- PIEDRAHITA, J. A., ANDERSON, G. B. & BONDURANT, R. H. 1990. Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell lines. *Theriogenology*, 34, 865-77.
- RODDA, D. J., CHEW, J. L., LIM, L. H., LOH, Y. H., WANG, B., NG, H. H. & ROBSON, P. 2005. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*, 280, 24731-7.
- ROSSANT, J. 2001. Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells*, 19, 477-82.
- SAITO, S., UGAI, H., SAWAI, K., YAMAMOTO, Y., MINAMIHASHI, A., KUROSAKA, K., KOBAYASHI, Y., MURATA, T., OBATA, Y. & YOKOYAMA, K. 2002. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. *FEBS Lett*, 531, 389-96.

- SAITO, S., YOKOYAMA, K., TAMAGAWA, T. & ISHIWATA, I. 2005. Derivation and induction of the differentiation of animal ES cells as well as human pluripotent stem cells derived from fetal membrane. *Hum Cell*, 18, 135-41.
- SATO, N., MEIJER, L., SKALTSOUNIS, L., GREENGARD, P. & BRIVANLOU, A. H. 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, 10, 55-63.
- SAXENA, S., HANWATE, M., DEB, K., SHARMA, V. & TOTTEY, S. 2008. FGF2 secreting human fibroblast feeder cells: a novel culture system for human embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev*, 75, 1523-32.
- SMITH, A. G., HEATH, J. K., DONALDSON, D. D., WONG, G. G., MOREAU, J., STAHL, M. & ROGERS, D. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336, 688-90.
- SMITH, R. K. & WEBBON, P. M. 2005. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: Heralding a new dawn? *Br J Sports Med*, 39, 582-84.
- SOLTER, D. 2006. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet*, 7, 319-27.
- STRELCHENKO, N., VERLINSKY, O., KUKHARENKO, V. & VERLINSKY, Y. 2004. Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online*, 9, 623-9.
- TAM, P. P. & ROSSANT, J. 2003. Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. *Development*, 130, 6155-63.

- TARKOWSKI, A. K., WITKOWSKA, A. & OPAS, J. 1977. Development of cytochalasin in B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 41, 47-64.
- TECIRLIOGLU, R. T. & TROUNSON, A. O. 2007. Embryonic stem cells in companion animals (horses, dogs and cats): present status and future prospects. *Reprod Fertil Dev*, 19, 740-7.
- THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S. & JONES, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-7.
- THOMSON, J. A., KALISHMAN, J., GOLOS, T. G., DURNING, M., HARRIS, C. P., BECKER, R. A. & HEARN, J. P. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7844-8.
- TOJO, M., HAMASHIMA, Y., HANYU, A., KAJIMOTO, T., SAITOH, M., MIYAZONO, K., NODE, M. & IMAMURA, T. 2005. The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. *Cancer Sci*, 96, 791-800.
- TREMOLEDA, J. L., STOUT, T. A., LAGUTINA, I., LAZZARI, G., BEVERS, M. M., COLENBRANDER, B. & GALLI, C. 2003. Effects of in vitro production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. *Biol Reprod*, 69, 1895-906.
- VACKOVA, I., UNGROVA, A. & LOPES, F. 2007. Putative embryonic stem cell lines from pig embryos. *J Reprod Dev*, 53, 1137-49.

- VERMA, V., GAUTAM, S. K., SINGH, B., MANIK, R. S., PALTA, P., SINGLA, S. K., GOSWAMI, S. L. & CHAUHAN, M. S. 2007. Isolation and characterization of embryonic stem cell-like cells from in vitro-produced buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Mol Reprod Dev*, 74, 520-9.
- WAKAYAMA, S., HIKICHI, T., SUETSUGU, R., SAKAIDE, Y., BUI, H. T., MIZUTANI, E. & WAKAYAMA, T. 2007. Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies. *Stem Cells*, 25, 986-93.
- WAKAYAMA, S., JAKT, M. L., SUZUKI, M., ARAKI, R., HIKICHI, T., KISHIGAMI, S., OHTA, H., VAN THUAN, N., MIZUTANI, E., SAKAIDE, Y., SENDA, S., TANAKA, S., OKADA, M., MIYAKE, M., ABE, M., NISHIKAWA, S., SHIOTA, K. & WAKAYAMA, T. 2006. Equivalency of nuclear transfer-derived embryonic stem cells to those derived from fertilized mouse blastocysts. *Stem Cells*, 24, 2023-33.
- WANG, J., RAO, S., CHU, J., SHEN, X., LEVASSEUR, D. N., THEUNISSEN, T. W. & ORKIN, S. H. 2006. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, 444, 364-8.
- WANG, S., TANG, X., NIU, Y., CHEN, H., LI, B., LI, T., ZHANG, X., HU, Z., ZHOU, Q. & JI, W. 2007. Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25, 481-9.
- WILKE, M. M., NYDAM, D. V. & NIXON, A. J. 2007. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res*, 25, 913-25.

- WILLERT, K. & JONES, K. A. 2006. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev*, 20, 1394-404.
- WILLIAMS, R. L., HILTON, D. J., PEASE, S., WILLSON, T. A., STEWART, C. L., GEARING, D. P., WAGNER, E. F., METCALF, D., NICOLA, N. A. & GOUGH, N. M. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336, 684-7.
- WU, M. Y. & HILL, C. S. 2009. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell*, 16, 329-43.
- XI, R. & XIE, T. 2005. Stem cell self-renewal controlled by chromatin remodeling factors. *Science*, 310, 1487-9.
- XU, R. H., CHEN, X., LI, D. S., LI, R., ADDICKS, G. C., GLENNON, C., ZWAKA, T. P. & THOMSON, J. A. 2002. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol*, 20, 1261-4.
- YING, Q. L., NICHOLS, J., CHAMBERS, I. & SMITH, A. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115, 281-92.
- YU, J. & THOMSON, J. A. 2008. Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev*, 22, 1987-97.
- ZENG, X. 2007. Human embryonic stem cells: mechanisms to escape replicative senescence? *Stem Cell Rev*, 3, 270-9.
- ZUCCOTTI, M., MERICO, V., REDI, C. A., BELLAZZI, R., ADJAYE, J. & GARAGNA, S. 2009. Role of Oct-4 during acquisition of developmental competence in mouse oocyte. *Reprod Biomed Online*, 19 Suppl 3, 57-62.

ZWAKA, T. P. & THOMSON, J. A. 2005. A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development*, 132, 227-33.

