

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**La dérivation de cellules souches embryonnaires chez le  
rat, *Rattus norvegicus***

par

Simon-Pierre Demers

Département de biomédecine vétérinaire

Centre de recherche en reproduction animale

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

*Philosophiae Doctor* (Ph.D.)

en sciences vétérinaires

option reproduction

Avril, 2009

© Simon-Pierre Demers, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée

**LA DÉRIVATION DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES  
CHEZ LE RAT, *RATTUS NOVEGICUS***

présentée par

SIMON-PIERRE DEMERS

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Alan K. Goff, président-rapporteur

Lawrence C. Smith, directeur de recherche

Bruce D. Murphy, codirecteur

David W. Silversides, membre du jury

Alan C. Peterson, examinateur externe

Mario Jacques, représentant du doyen de la FÉSP



## RÉSUMÉ

Le rat (*Rattus norvegicus*) est une espèce d'importance majeure en recherche biomédicale. Malgré des efforts soutenus, le développement de la technologie du ciblage de gènes n'est pas encore achevé chez cette espèce. À cette fin, la première étape consiste à générer des lignées de cellules souches embryonnaires (ES) pluripotentes capables de contribuer aux tissus lors du développement embryonnaire, y compris aux cellules germinales. Dans ce contexte, une compréhension des mécanismes régissant le destin cellulaire et l'état pluripotent durant les premiers stades de la dérivation de cellules ES à partir de blastocystes est essentielle. L'objectif principal de cette étude est de dériver une lignée de cellules ES chez le rat capable de contribuer aux tissus de l'embryon lors du développement embryonnaire.

Le premier objectif consiste à dériver une lignée de cellules ES chez le rat, et à examiner la capacité de développement de ces cellules. Nous déterminons pour la première fois qu'une lignée de cellules de type ES chez le rat (RESL) possède plusieurs caractéristiques de cellules pluripotentes à l'aide de caractérisation de marqueurs in vitro, et que ces cellules peuvent contribuer de manière normale aux tissus extraembryonnaires durant le développement.

Le deuxième objectif est d'identifier les causes de l'exclusion de cellules RESL aux tissus embryonnaires. Leur capacité de développement est évaluée en utilisant diverses approches

in vitro et in vivo. Nous déterminons que les cellules RESL possèdent non seulement une capacité pluripotente in vitro, mais aussi une capacité multipotente in vivo, démontrée par leur contribution à de multiples lignages extraembryonnaires lors du développement. De plus, les cellules RESL constituent une population hétérogène, expliquant leur exclusion des lignages embryonnaires in vivo.

Le troisième objectif est d'identifier le rôle joué par les conditions de culture et par des voies de signalisation dans la détermination du destin cellulaire et le maintien de l'état pluripotent, à la fois dans les embryons et durant le processus de dérivation de cellules ES chez le rat. Nous définissons des conditions de culture qui permettent le maintien de cellules pluripotentes tout en inhibant la formation d'endoderme primitif (PrE) lors de la dérivation de cellules ES à partir d'embryons.

En résumé, nous démontrons la contribution in vivo de cellules RESL et leur caractère hétérogène, ainsi que les conditions de cultures requises pour les maintenir dans un état indifférencié. Ces résultats augmentent nos connaissances en matière du maintien de l'état pluripotent chez le rat et aideront au développement de conditions de culture permettant la croissance sélective de cellules ES pluripotentes capables de contribuer de manière efficace aux tissus embryonnaires et germinaux, un pré-requis pour la production de rats modifiés génétiquement de manière ciblée.

**Mots-clés :** Cellules souches embryonnaires, blastocyste, capacité de développement, destin cellulaire, hétérogénéité, développement embryonnaire, culture in vitro, rat.

## ABSTRACT

The rat (*Rattus norvegicus*) is a species of major importance to biomedical research. Despite repeated efforts, the development of gene-targeting technology has not yet been achieved in this species. To this end, the first step consists in generating pluripotent embryonic stem (ES) cell lines capable of contributing to tissues during development, including the germline. In this context, comprehension of the mechanisms regulating cell fate and the pluripotent state during the first stages of derivation of ES cells from blastocysts is essential. The overall objective of this study is to derive a rat ES cell line capable of contributing to tissues of the developing embryo.

The first objective consists in deriving a rat ES cell line, and to examine the developmental capacity of these cells. We determine for the first time that a rat ES-like (RESL) cell line displaying multiple characteristics of pluripotent cells, as shown by in vitro marker characterization, can contribute normally to developing extraembryonic tissues.

The second objective is to identify the causes for exclusion of RESL cells from embryonic contribution. Their developmental capacity is evaluated using a variety of in vitro and in vivo approaches. We determine that RESL cells not only display pluripotent capacity in vitro, but also multipotent capacity in vivo, as demonstrated by their contribution to multiple extraembryonic lineages during development. In addition, RESL cells are a heterogeneous population, which explains their exclusion from embryonic lineages in vivo.

The third objective is to identify the role played by culture conditions and signalling pathways in cell fate determination and pluripotency maintenance in embryos as well as during the ES cell derivation process in the rat. We define culture conditions that permit the maintenance of pluripotent cells while inhibiting the formation of primitive endoderm during the derivation of ES cells from blastocysts.

In summary, we demonstrate the *in vivo* contribution of RESL cells and their heterogeneous nature, as well as the culture conditions required for their maintenance in the undifferentiated state. These results extend our understanding of the culture conditions required for pluripotency maintenance in the rat and will help in the development of culture conditions permitting the selective growth of pluripotent ES cells capable of contributing efficiently to embryonic and germline tissues, a pre-requisite for the production of gene-targeted rats.

**Keywords:** Embryonic stem cells, blastocyst, developmental capacity, cell fate, heterogeneity, embryonic development, *in vitro* culture, rat.



## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES FIGURES.....	xvi
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	xviii
DÉDICACE.....	xxi
REMERCIEMENTS.....	xxii
1.0 INTRODUCTION .....	1
2.0 RECENSION DE LA LITTÉRATURE .....	5
2.1 Les cellules souches pluripotentes .....	5
2.1.1 Historique de l'étude des cellules souches pluripotentes.....	5
2.1.2 Dérivation et culture in vitro de cellules ES .....	8
2.2 Propriétés des cellules ES: Origine et caractérisation.....	10
2.2.1 Propriétés des cellules ES .....	10
2.2.2 L'état pluripotent.....	11
2.2.3 Les marqueurs de l'état pluripotent.....	12
2.3 Les voies de signalisation impliquées dans le maintien de l'état pluripotent .....	16
2.3.1 Les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) et le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF).....	16
2.3.2 La voie des MAPK.....	17

2.3.3 La voie des Wnt .....	18
2.4 Embryologie et identité des différents types de cellules souches dans l'embryon ....	19
2.4.1 Embryologie et cellules souches de l'embryon .....	20
2.4.2 La provenance des cellules ES dans l'embryon.....	23
2.4.3 Équivalence des tissus de l'embryon et des lignées établies.....	24
2.5 Méthodes d'évaluation de la capacité de développement.....	25
2.5.1 Différenciation in vitro.....	26
2.5.2 Formation de tératomes.....	27
2.5.3 Le chimérisme embryonnaire et la contribution à la lignée germinale.....	28
2.6 Applications des cellules ES chez les souris.....	29
2.6.1 L'inactivation de gènes par recombinaison homologue .....	29
2.6.2 Les modèles murins de maladies humaines .....	31
2.7 Le rat comme modèle.....	33
2.7.1 Avantages que présente le rat comme modèle de recherche.....	33
2.7.2 La situation actuelle: exemples et limitations de l'utilisation du rat .....	34
2.7.3 Études antérieures sur les ES chez le rat.....	36
3.0 ARTICLE PREMIER .....	39
Running head: In vivo contribution of rat ES-like cells .....	39
3.1 ABSTRACT .....	40
3.2 INTRODUCTION .....	41
3.3 MATERIALS AND METHODS.....	43

3.3.1 Animals, derivation and culture of rat ES-like cell lines. ....	43
3.3.2 In vitro characterisation, vector construction, transfection and selection of rat ES-like cells. ....	44
3.3.3 Blastocyst injection and embryo transfer. ....	46
3.3.4 DNA isolation and microsatellite analysis. ....	47
3.3.5 Statistical analysis. ....	47
3.4 RESULTS .....	47
3.4.1 Rat inner cell mass (ICM)-derived cell lines express markers typical of ES cells and are amenable to genetic modification. ....	47
3.4.2 Blastocyst injection of rat ES-like cells and embryo transfer. ....	51
3.4.3 Rat ES-like cells can contribute to extraembryonic tissues in vivo. ....	52
3.5 DISCUSSION .....	53
3.6 ACKNOWLEDGMENTS .....	58
3.7 REFERENCES.....	59
3.8 FIGURES AND TABLES .....	63
4.0 ARTICLE DEUXIÈME.....	74
Running Head: Heterogeneity of Rat Embryonic Stem-Like Cells.....	74
4.1 ABSTRACT .....	75
4.2 INTRODUCTION .....	77
4.3 MATERIALS AND METHODS.....	79
4.3.1 Cell Culture .....	79

4.3.2 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction and Genomic DNA Analysis	79
4.3.3 Immunofluorescence and Flow Cytometry	81
4.3.4 Animals, Embryos and Procedures	82
4.3.5. Immunohistochemistry	83
4.3.6. Statistical analysis	83
4.4 RESULTS	84
4.4.1 RESL Cells Express Multiple Pluripotency Markers	84
4.4.2 Cell Fate Analysis Reveals In Vivo Multipotency of RESL Cells Following Blastocyst Injection and Embryo Transfer	84
4.4.3 Embryo Aggregation and Transfer Assays Also Reveal In Vivo Multipotency of RESL Cells	86
4.4.4 RESL Cells Display Pluripotent Capacity Via In Vitro Differentiation Into the Three Primary Germ Layers of the Embryo Proper	89
4.4.5 The Expression Profile of RESL Cells Before and After Differentiation Reveals Similarities to Mouse Epiblast Stem Cells and Human ES Cells	90
4.4.6 RESL Cells Display Features of Heterogeneity While Maintaining Expression of Multiple Pluripotency Markers Under Conditions Favoring Differentiation	91
4.5 DISCUSSION	92
4.6 CONCLUSION	96
4.7 ACKNOWLEDGMENTS	96
4.8 REFERENCES	98

4.9 FIGURES AND TABLES .....	103
5.0 ARTICLE TROISIÈME .....	116
Running head: Combined MEK and GSK3 inhibition maintains pluripotency of rat embryonic cells .....	116
5.2 BACKGROUND .....	118
5.3 METHODS .....	120
5.3.1 Animals and Embryo Recovery .....	120
5.3.2 RNA Isolation and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) .....	120
5.3.3 Embryo Culture and Treatments .....	121
5.3.4 Immunofluorescence .....	122
5.3.5 Statistical Analyses .....	123
5.4 RESULTS .....	123
5.4.1 Early lineage markers of ICM, TE, and PrE are expressed in the pre-implantation rat embryo .....	123
5.4.2 Morphological differences in blastocyst primary outgrowths cultured in the absence of serum.....	124
5.4.3 MEK inhibition increases the relative size of internal vesicles within primary blastocyst outgrowths.....	125
5.4.4 Inhibition of MEK in the absence of serum inhibits the formation of internal vesicles and the presence of exclusively Oct4-positive cells.....	126

5.4.5 U0126 inhibits progression of rat embryos to the blastocyst stage during in vitro development .....	127
5.4.6 Simultaneous inhibition of GSK3 and MAPK acts synergistically to promote internal vesicle formation, proliferation and retention of exclusively Oct4-positive cells in the presence of serum.....	128
5.5 DISCUSSION .....	129
5.6 CONCLUSIONS.....	133
5.7 ACKNOWLEDGMENTS .....	134
5.8 REFERENCES.....	135
5.9 TABLES AND FIGURES .....	138
6.0 DISCUSSION GÉNÉRALE .....	151
6.1 La contribution in vivo des cellules RESL .....	152
6.2 Les similitudes et les différences interespèces.....	158
6.3 Les particularités de l'embryologie chez le rat .....	161
6.4 Directions futures .....	165
7.0 CONCLUSIONS GÉNÉRALES .....	167
7.1 La dérivation de cellules RESL et leur contribution in vivo.....	167
7.2 L'évaluation de la capacité de développement des cellules RESL révèle leur hétérogénéité .....	168

7.3 Le traitement d'embryons et d'explants de blastocystes avec des inhibiteurs de MEK et GSK3 maintient la pluripotentialité et perturbe le développement pré-implantatoire chez le rat .....	169
8.0 BIBLIOGRAPHIE.....	I

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 3.1	Strain-dependent efficiency of rat ES-like cell line derivation.....	63
Tableau 3.2	Characterisation of rat ES-like cell lines.....	64
Tableau 3.3	Extraembryonic contribution of rat ES-like cell line ICM17.....	65
Tableau 4.1	In vitro and in vivo development of rat 2n and 4n embryo aggregates.....	103
Tableau 5.1	In vitro development of rat pre-implantation embryos in the presence of MEK inhibitor U0126 (20 $\mu$ M).....	138



## LISTE DES FIGURES

### Article premier

- Figure 3.1 Rat ICM-derived cell lines exhibit morphological and molecular markers of undifferentiated cells.....66
- Figure 3.2 Oct4 expression, normal diploid karyotype and EYFP transgene expression of ICM17 rat ES-like cell line.....68
- Figure 3.3 In vivo pluripotency assay for rat ES-like cells.....70
- Figure 3.4 In vivo contribution of rat ES-like cells to extraembryonic tissues...72

### Article deuxième

- Figure 4.1 Undifferentiated RESL cells express multiple pluripotent cell markers.....104
- Figure 4.2 Cell fate analysis reveals in vivo multipotency of RESL cells.....106
- Figure 4.3 Generation of diploid (2n) and tetraploid (4n) embryo aggregates with RESL cells.....108
- Figure 4.4 In vivo multipotency of RESL cells following aggregation and embryo transfer.....110
- Figure 4.5 In vitro pluripotency of RESL cells via differentiation into the three primary embryonic germ layers.....112

Figure 4.6	Epiblast and pluripotent marker expression profile of RESL cells under differentiation-inducing conditions reveals their culture requirements and heterogeneity.....	114
Article Troisième		
Figure 5.1	Early lineage markers of ICM, TE, and PrE are expressed in the pre-implantation rat embryo.....	139
Figure 5.2	Absence of serum engenders differences in morphology of primary outgrowths.....	141
Figure 5.3	MEK inhibitor PD98059 increases the relative size of internal vesicles within primary blastocyst outgrowths at 50 $\mu$ M.....	143
Figure 5.4	MEK inhibitor U0126 inhibits internal vesicle formation and the presence of exclusively Oct4-positive cells in the absence of serum.....	145
Figure 5.5	GSK3 inhibition promotes PrE formation rather than maintenance of pluripotent cells.....	147
Figure 5.6	U0126 and GSK3 inhibitor BIO act synergistically to maintain exclusively Oct4-positive cells in the presence of serum.....	149

**LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS**

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP	Phosphatase alcaline
ARN	Acide ribonucléique
BIO	6-bromoindirubin-3'-oxime
BMP4	Protéine de morphogénèse osseuse 4
BN	Brown Norway
Cdx2	Homéodomaine de type caudal 2
dpc	Jours post-coïtum
EB	Corps embryoides
EC	Carcinome embryonnaire
ENU	N-ethyl-N-nitrosouréa
EpiSC	Cellules souches de l'épiblaste
ERK1/2	Kinases 1 et 2 régulées par signaux extracellulaires
ES	Souches embryonnaires
FBS	Sérum bovin fœtal
FGF	Facteur de croissance de fibroblastes
Foxa2	Forkhead box A2
GFP	Protéine fluorescente verte
gp130	Glycoprotéine 130

GSK3	Kinase glycogène synthéase 3
HLA-B27	Antigène de leucocyte humain-B27
HMG	Groupe à haute mobilité
ICM	Masse cellulaire interne
LIF	Facteur inhibiteur de la leucémie
LIFR	Récepteur de LIF
MAPK	Kinases activées par des mitogènes
MAPKK ou MEK	MAPK kinase
MEF	Fibroblastes embryonnaires murins
Oct4	Octamère 4
PGC	Cellules germinales primordiales
PrE	Endoderme primitif
QTL	Loci de traits quantitatifs
RESL	Lignées de type ES chez le rat
siRNA	ARN d'interférence court
SNP	Courts polymorphismes de nucléotides
Sox2	Région déterminante du sexe-Y-domaine 2
Sparc	Protéine sécrétée acide riche en cystéine
SSEA-1	Antigène de stade spécifique-1
STAT3	Transducteur de signal et activateur de transcription 3

Tcf/Lef	Facteur de cellules T/ Facteur promoteur des lymphoïdes
TE	Trophectoderme
TGCT	Tumeur testiculaire des cellules germinales
TS	Cellules souches du trophoblaste
XEN	Cellules souches de l'endoderme extraembryonnaire

*À ma famille et mes amis*

## REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Lawrence C. Smith, de m'avoir donné cette opportunité de m'initier à ce domaine passionnant qui a pris beaucoup de place dans ma vie. Je le remercie d'avoir eu confiance en moi, pour la liberté qu'il m'a accordée, et aussi pour son soutien et ses encouragements dans mon cheminement depuis le tout début de mes études supérieures. Je suis reconnaissant envers lui pour le rôle qu'il a joué dans mon développement professionnel et personnel, et je ne l'oublierai jamais.

J'aimerais aussi remercier mon co-directeur, Bruce D. Murphy, pour ses conseils judicieux, sa participation active dans mon cheminement scientifique et pour m'avoir initié aux aspects de la recherche dont j'ignorais l'existence. Grace à ces deux personnes, j'ai pu bénéficier de compétences complémentaires qui ont agi en synergie pour me permettre de me dépasser, et je les remercie sincèrement pour leur rôles respectifs et pour leur amitié.

Je remercie mes collègues de laboratoire et amis, en commençant par Carmen Léveillé, qui m'a transmis ses connaissances en culture cellulaire et en toutes choses maskoutaines. Ces deux éléments m'auront été extrêmement utiles durant mon séjour à St-Hyacinthe. Merci à Jacinthe Therrien, pour sa contribution essentielle dans ma formation en biologie moléculaire et pour sa bonne humeur contagieuse. Je remercie France Filion et Patrick

Vincent pour leur aide et pour les bons moments partagés durant toutes ces années. J'aimerais remercier les anciens membres du laboratoire, Jae Gyu Yoo, Joao Suzuki, Yuichi Kameyama et Francisco Viramontes pour leur amitié et les connaissances qu'ils m'ont transmises. Je tiens à remercier Donald Boucher, Saloua Benmouissa, Jacob Thundathil, et Li Lian, qui ont rendu l'atmosphère de travail agréable.

Je tiens à remercier les membres et amis au CRRA. En particulier, merci infiniment à Micheline Sicotte, pour son amitié, son écoute, ses qualités humaines, ses connaissances en matière de tout ce qui touche de près ou de loin au CRRA, et pour ses réponses à mes mille-et-une questions. Merci à Diane Rodier et Micheline St-Germain, qui ont su me diriger dans mes recherches de bourses et de conseils académiques tout au long de mon parcours. Merci aussi à Mira Dobias, Isabelle Daneau, Manon Salvat, Diana Raiwet, à Marina Poulin et Normand Lacasse pour leur soutien infailible à l'animalerie, Raphaëlle Auclair, Vickie Roussel, Catherine Dolbec, Leonor Miranda Jimenez, Adrian Quero, Khampoune Sayasith, Mame Nahe Diouf, Mingju Cao, Edmir Nicola et Dan Arnold.

Merci à Alexandre Boyer, Arnaud Duval, François Fontaine, Tania Fayad, Sandra Ledoux, Adriana Verduzco, Érika Guerreiro, Norma Ybarra, Richard Graveline, Aron Cory, Pavine Lefèvre, Kristy Brown, Véronique Paradis, et Kalidou N'Diaye pour les moments agréables passés en dehors des activités du laboratoire.



Merci aussi à Alan Goff pour son soutien et son amitié, à David Silversides pour ses conseils, et à Derek Boerboom, Pascal Vachon, Daniel Dufort et Éric Troncy pour leurs commentaires constructifs.

Je remercie ma famille, Michel, Pétra, Martin, Justin, Elli et Aurore, pour leur soutien inconditionnel, leur présence et leur compréhension durant les moments joyeux et moins joyeux de mon parcours.

Finalement, la dernière mais non la moindre, Joëlle Desmarais. Par où commencer? Celle avec qui je partage mes passions pour la science, pour le voyage, pour la vie. Elle est ma partenaire de vie et de laboratoire, ma collègue, mais surtout ma meilleure amie. Sans elle je ne sais pas à quoi aurait ressemblé mon séjour au CRRA. Sa persévérance, sa détermination et son sens du travail ne cessent de m'inspirer. Je la remercie du fond de mon cœur pour son aide, et je lui en serai toujours reconnaissant.

## 1.0 INTRODUCTION

Le rat est une espèce de grande importance en recherche biomédicale. La quantité impressionnante de données disponibles concernant la physiologie de cette espèce, dans des domaines aussi variés que le comportement, la toxicologie, le cancer, les maladies cardiovasculaires pour en nommer quelques-uns, a déjà contribué à améliorer nos connaissances de ce qui constitue l'état normal et pathologique chez les mammifères et chez l'humain en particulier. Par contre, ces données accumulées pourraient être exploitées de manière beaucoup plus efficace si la technologie du ciblage de gènes était disponible chez cette espèce.

Actuellement, la souris est devenue le modèle d'étude courant préféré pour de nombreuses études génétiques, grâce en majeure partie à la disponibilité des cellules souches embryonnaires (ES) murines et d'une technologie associée, le ciblage de gènes. Ces cellules aux propriétés et utilités diverses sont tout à fait fascinantes. Leur capacité à être cultivées *in vitro* et manipulées génétiquement tout en demeurant indifférenciées et en conservant leur état pluripotent est unique. Mais ce qui les distingue avant tout est leur capacité à se réintégrer à l'environnement embryonnaire d'une manière tout à fait complète, même après avoir subi de multiples manipulations *in vitro*. La cellule souche embryonnaire peut s'intégrer à un embryon au stade pré-implantatoire et, forte du soutien de ce nouvel environnement et de ses capacités pluripotentes, peut générer à elle seule tous les types cellulaires du fœtus, y compris les cellules germinales. De cette manière, des modifications

génétiques ciblées peuvent être apportées aux cellules ES en culture, les cellules désirées peuvent être sélectionnées et servir de véhicules pour transporter ces modifications aux générations subséquentes.

L'usage de cette technologie est devenu tellement répandu qu'il arrive parfois que les cellules ES soient en quelque sorte prises pour acquis. En effet, les connaissances fondamentales entourant le maintien de l'état pluripotent ont tardé à voir le jour, et ce sont les applications des cellules ES en recombinaison homologue pour générer des modèles de souris qui ont occupé les esprits et les ressources durant de nombreuses années. Suite à la reconnaissance de la valeur de cette technologie, et des avantages à ce qu'elle soit disponible chez d'autres espèces d'importance en recherche biomédicale, un intérêt particulier s'est manifesté pour développer cette technologie chez le rat. C'est dans ce contexte que s'inscrivent nos études.

Les cellules ES proviennent des tissus pluripotents de l'embryon. Suite à une explantation in vitro, les tissus pluripotents sont soigneusement cultivés et sélectionnés jusqu'à la production d'une lignée. L'expression de marqueurs connus de cellules pluripotentes aide à la sélection des types recherchés, et agit comme sorte d'outil diagnostique. Toutefois, avant de pouvoir affirmer qu'une lignée de cellules embryonnaires soit pluripotente, elle doit démontrer la capacité de contribuer in vivo aux tissus en développement. Plus précisément, elle doit pouvoir contribuer particulièrement aux cellules germinales. La meilleure manière

de tester la capacité de développement de cellules embryonnaires est d'introduire ces cellules dans des embryons au stade pré-implantatoire et d'analyser sa contribution aux tissus *in vivo*.

Notre premier objectif était de tenter la dérivation de cellules ES chez le rat en utilisant les conditions de culture décrites chez la souris. Quelques essais antérieurs avaient été menés et publiés dans la littérature. En général, les lignées de cellules de type ES décrites ne correspondaient pas entièrement aux lignées de cellules ES disponibles chez la souris, mais les différences biologiques entre le rat et la souris étaient insoupçonnées. De plus, dans la plupart des cas, la capacité de développement n'était pas évaluée. Une de nos premières expériences a donc été de vérifier la capacité de développement des cellules obtenues lors des premiers essais de dérivation en les injectant dans des blastocystes.

L'intérêt pour le domaine des cellules ES a par la suite pris beaucoup d'expansion en peu de temps, et des techniques de plus en plus sophistiquées devenaient rapidement disponibles pour caractériser et analyser le comportement des cellules ES *in vivo*. Notre deuxième objectif a donc été de tenter de mieux cerner la nature des cellules obtenues dans le contexte des premières études, et d'exploiter les nouvelles approches et techniques développées chez la souris en les appliquant au rat. Notre hypothèse était que l'embryon hôte jouait un rôle clé dans la détermination du destin cellulaire des cellules de rat. En raffinant les méthodes développées au courant de l'étude précédente, nous avons été en

mesure de proposer une nouvelle approche pour générer des chimères embryonnaires chez le rat et d'analyser la contribution des cellules aux tissus in vivo.

Les résultats obtenus suite à l'achèvement de ces deux premiers objectifs nous ont mené à tenter de mieux comprendre l'état pluripotent chez le rat. Une meilleure compréhension du développement embryonnaire permettrait de mieux contrôler le destin cellulaire in vitro lors de la dérivation de cellules ES chez le rat, ce qui permettrait de maintenir de grandes quantités de ces cellules dans un état pluripotent et indifférencié. Par le fait même, la contribution efficace de ces cellules aux tissus de l'embryon en développement ainsi qu'aux cellules germinales se verrait améliorée et permettrait peut-être éventuellement de générer efficacement des rats génétiquement modifiés de manière ciblée. L'objectif de la troisième étude était donc d'identifier de manière systématique et de comprendre le rôle des voies de signalisation et des conditions de culture impliquées dans le maintien de l'état pluripotent dans l'embryon du rat lors de la dérivation de cellules ES.

## **2.0 RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

### **2.1 Les cellules souches pluripotentes**

#### **2.1.1 Historique de l'étude des cellules souches pluripotentes**

Les domaines des cellules ES et des cellules pluripotentes attirent beaucoup d'attention depuis quelques années. D'un côté, la promesse d'un immense potentiel bénéfique et de l'autre, des perceptions éthiques et morales réelles et perçues, tout ceci combiné à une couverture médiatique considérable. Le tout a su attiser l'intérêt autant des chercheurs que du public pour ces fascinantes cellules. Il est important de se rappeler que les connaissances qui ont permis le développement de ce domaine au niveau où il est rendu aujourd'hui ont été acquises suite à de nombreuses années d'études (Yu and Thomson 2008). En effet, nos connaissances en matière de cellules ES reposent sur des assises solidement bâties à travers des années de recherche (Solter 2006). Les premiers balbutiements de recherche expérimentale portant sur les cellules souches pluripotentes apparentées aux cellules ES peuvent être tracés aux études menées par Leroy Stevens il y a de ça plus de 50 ans. Ce dernier a observé un taux relativement élevé de tumeurs testiculaires des cellules germinales (TGCT) spontanées chez les souris mâles de la souche 129 (Stevens and Little 1954), un cancer qui se manifestait par la présence d'une tumeur testiculaire, un tératome, composée de plusieurs types cellulaires très variés et différenciés. Peu après, Stevens remarqua qu'une transplantation de crêtes génitales provenant de fœtus de souris de diverses souches aux testicules de souris adultes donnait également lieu à des tératomes, ce qui a permis d'établir que les cellules germinales primordiales (PGC) étaient à la source de

ces tumeurs (Stevens 1964). Certaines des tumeurs, nommées tératocarcinomes, possédaient une capacité régénératrice et ont mené à l'hypothèse qu'il existait une sorte de cellule souche du tératome (Andrews 2002). Des études menées par Kleinsmith et Pierce ont démontré l'existence d'un compartiment souche des tumeurs composé de cellules de carcinome embryonnaire (EC) (Kleinsmith and Pierce 1964). Ces cellules EC, suite à des transplantations en série à des hôtes successifs, pouvaient récapituler à chaque fois tous les tissus du tératocarcinome (Kleinsmith and Pierce 1964). C'était en quelque sorte l'événement fondateur du concept d'une cellule souche pluripotente (Yu and Thomson 2008).

Les cellules EC n'ont cependant pas seulement été étudiées dans le contexte de transplantations. Leur explantation en culture *in vitro* fut une étape importante vers l'établissement des conditions de culture pour les cellules souches pluripotentes, et des méthodes plus raffinées furent développées pour permettre leur amplification en vue d'études de différenciation *in vitro* (Kahan and Ephrussi 1970; Martin and Evans 1974). Une de ces méthodes consistait à utiliser une monocouche de cellules nourricières, souvent composée de fibroblastes d'origine foetale, comme source de facteurs solubles et comme soutien physique (Smith 2001; Solter 2006). Cultivées de cette manière, des lignées clonales de cellules EC ont pu être établies et pouvaient proliférer indéfiniment en culture. Leur pluripotentialité a pu être démontrée autant *in vitro* qu'*in vivo*, car elles pouvaient se différencier *in vitro* en structures semblables à des embryons, les corps embryoïdes (EB), et pouvaient également former des tératocarcinomes lorsqu'injectées de manière sous-cutanée

(Martin and Evans 1975; Solter 2006). Le test ultime de capacité de différenciation était d'introduire ces cellules EC dans les embryons en développement, et des expériences en ce sens menées par Brinster ont démontré que certaines lignées pouvaient contribuer à plusieurs tissus lors du développement embryonnaire (Brinster 1974; Smith 2001). Par contre, la plupart des lignées de cellules EC ont un potentiel beaucoup plus restreint et ne peuvent contribuer aux tissus de l'embryon in vivo, ceci étant attribué au fait que ces cellules sont souvent aneuploïdes (Atkin, Baker et al. 1974).

Une autre importante série d'expériences connexes a contribué à l'élucidation de l'identité embryonnaire des cellules EC. Des tératocarcinomes étaient aussi obtenus lorsque des embryons à différents stades précédant la gastrulation étaient transplantés à des sites autres que l'utérus (Solter, Skreb et al. 1970; Stevens 1970). Ces études ont donc démontré que non seulement les cellules souches pouvant générer des tératocarcinomes étaient présentes aussi bien dans les embryons que dans les crêtes génitales foetales, mais aussi que ces cellules pluripotentes provenaient de l'épiblaste et non pas d'autres parties de l'embryon (Diwan and Stevens 1976; Smith 2001; Chambers and Smith 2004). D'autres études soulignent qu'il existe de fortes similitudes entre les marqueurs exprimés par les cellules EC et les marqueurs exprimés par les cellules souches de l'embryon (Gachelin, Kemler et al. 1977; Solter and Knowles 1978; Martin 1980).



### 2.1.2 Dérivation et culture in vitro de cellules ES

Indéniablement, les pratiques et méthodes acquises avec la culture in vitro des cellules EC ont été très utiles pour établir des lignées ES à partir d'embryons, notamment le concept de la co-culture avec les cellules fibroblastes nourricières qui permettait la culture de lignées EC ayant le plus de potentiel pour le développement (Smith 2001). Une limitation importante avec la culture de lignées EC était que ces lignées, dérivées d'une tumeur ou bien d'un embryon transplanté, possédaient des lésions génétiques attribuées à leur transformation oncogénique à l'intérieur de la tumeur (Wobus and Boheler 2005). La prochaine étape fut donc de tenter d'isoler des cellules souches directement de l'embryon, sans passer par l'intermédiaire du tératocarcinome. Deux équipes de chercheurs, ayant précédemment identifié l'importance de la co-culture avec des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) inactivées mitotiquement, ont dérivé pour la première fois et de manière indépendante des lignées de cellules ES directement à partir de l'embryon murin de stade blastocyste (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Ces études ont permis d'identifier la masse cellulaire interne (ICM) du blastocyste comme étant la source des cellules ES dans l'embryon (Brook and Gardner 1997).

Le processus d'explantation de l'embryon et de dérivation d'une lignée de cellules ES est perçu en quelque sorte comme la capture et l'immortalisation d'un événement transitoire se déroulant in vivo (Rossant 2001). Dans l'embryon de stade blastocyste, la population de cellules pluripotentes précurseure de l'épiblaste, conservant la capacité de se différencier en

tous types cellulaires de l'embryon, n'est présente que pendant une courte période (Smith 2001).

Les méthodes de dérivation de lignées de cellules ES chez la souris ont peu changé depuis ces études séminales, du moins chez les quelques souches dites permissives à la dérivation (Smith 2001). Les blastocystes sont récoltés au jour 3.5 post-coitum (dpc) et placés dans un milieu de culture contenant du sérum bovin fœtal (FBS), du 2-mercaptoéthanol, ainsi que du facteur inhibiteur de la leucémie (LIF), sur une monocouche de MEF préalablement préparée. Ils sont ensuite cultivés in vitro dans un incubateur humidifié et chauffé à 37 degrés Celsius (Nagy 2003). Après 4 à 5 jours de culture, les blastocystes se sont bien attachés au Pétri et l'excroissance de l'ICM est bien entamée et visible - c'est alors que l'ICM est sélectivement aspiré à l'aide de pipettes Pasteur allongées pour l'isoler des autres types cellulaires présents à proximité (Nagy 2003). L'ICM est ensuite délicatement désagrégé en petites masses à l'aide d'un traitement enzymatique à la trypsine et de dissociation mécanique. Ces masses sont placées dans de nouveaux Pétris pour débiter la culture. Dans les jours qui suivent, les colonies de cellules ES sont identifiées par leur morphologie indifférenciée, et sont soumises à une expansion en culture sur une période de plusieurs semaines. La morphologie recherchée est celle de colonies composées de petites cellules ayant un gros noyau et plusieurs nucléoles ainsi qu'un petit cytoplasme, souvent foncé et peu granuleux (Solter 2006; Keefe, Pant et al. 2007). Ces cellules sont souvent collées ensemble, et les frontières les séparant sont difficilement distinguables (Hogan 1994). De plus, les bordures des colonies sont nettes et la morphologie indifférenciée se

maintient pourvu que des passages suffisamment fréquents soient effectués pour remplacer les nutriments et réduire la densité cellulaire. Les cellules ES murines sont normalement dissociées complètement à l'aide de traitement à la trypsine, et chacune de ces cellules peut reformer une nouvelle colonie à elle seule (Hogan 1994). Cette propriété, la clonalité, est une des caractéristiques de l'état pluripotent (Smith 2001). Cultivées de cette manière, et probablement parce qu'elles sont retirées de leur environnement, les cellules ES peuvent être maintenues indifférenciées indéfiniment, démontrant ainsi une caractéristique de cellules immortelles (Andrews 2002).

## **2.2 Propriétés des cellules ES: Origine et caractérisation**

### **2.2.1 Propriétés des cellules ES**

Les lignées ES sont cultivées pendant de longues périodes de temps, tout en demeurant indifférenciées et en conservant la capacité d'auto-renouvellement et de pluripotentialité (Nagy 2003). En culture, ces lignées ES sont immortelles et possèdent un caryotype normal, et elles demeurent capables de s'intégrer normalement à leur nouvel environnement suite à leur réintroduction dans un blastocyste (Solter 2006). Elles possèdent et maintiennent un caryotype diploïde stable, sont clonogéniques, facilement amplifiables, peuvent coloniser tous les tissus et les cellules germinales, et peuvent transmettre leur génome à la génération suivante par gamétogénèse (Boiani and Scholer 2005). Les cellules ES murines se divisent de manière symétrique environ toutes les 12 heures (Burdon, Smith

et al. 2002). En phase exponentielle d'auto-renouvellement, la plus grande proportion de cellules se retrouve dans la phase de synthèse d'ADN du cycle cellulaire, alors qu'une faible proportion de cellules se retrouve dans la première phase de croissance (Burdon, Smith et al. 2002).

D'autres propriétés importantes caractérisant l'état pluripotent sont un haut ratio noyau-cytoplasme, une activité élevée de phosphatase alcaline (AP), l'expression d'antigènes de surface tels que l'antigène de stade spécifique-1 (SSEA-1), et l'expression de marqueurs moléculaires de pluripotentialité tels que Nanog et Octamère-4 (Oct4) (Wobus, Holzhausen et al. 1984; Palmqvist, Glover et al. 2005). Une démonstration des propriétés fonctionnelles des cellules souches, e.g. la capacité de différenciation in vitro et in vivo, est essentielle pour caractériser l'état pluripotent (Nagy 2003; Boiani and Scholer 2005).

### **2.2.2 L'état pluripotent**

La pluripotentialité est une caractéristique fondamentale des cellules ES. Mais en quoi consiste l'état pluripotent? Un nombre grandissant de chercheurs s'entendent pour dire qu'une cellule pluripotente est une cellule qui possède la capacité de donner lieu aux trois feuillets germinatifs, donc à tous les types cellulaires de l'embryon et de l'adulte (Niwa 2001; Solter 2006). En ce sens, les cellules ES murines sont l'exemple parfait de cellules pluripotentes, car lorsqu'elles sont réintroduites dans un embryon, elles contribuent à tous

les types cellulaires de l'organisme, y compris aux cellules germinales (Bradley, Evans et al. 1984). En guise de comparaison, la cellule totipotente par excellence est le zygote, car celui-ci est capable de générer non seulement tous les tissus embryonnaires, mais également le placenta et tous les annexes extraembryonnaires (Yu and Thomson 2008). Les blastomères provenant d'embryons de stade deux cellules sont aussi réputés totipotents pour la même raison (Jaenisch and Young 2008). Les cellules ES ne peuvent cependant pas à elles seules soutenir le développement complet d'un organisme car elles ne peuvent pas fournir tous les tissus extraembryonnaires, du moins chez la souris (Lovell-Badge 2007).

### **2.2.3 Les marqueurs de l'état pluripotent**

Historiquement, les premiers marqueurs à être utilisés pour identifier et étudier les cellules pluripotentes étaient des marqueurs de surface cellulaires, ou d'activité enzymatique. Ces marqueurs devaient d'abord être spécifiques aux cellules pluripotentes, et devaient également être silencés lors de la différenciation (Solter 2006). Par exemple, SSEA-1 est un anticorps monoclonal réagissant de manière spécifique avec des antigènes présents sur les cellules EC murines (Solter and Knowles 1978). L'utilité de ces types d'anticorps a été établie dans la caractérisation des tissus embryonnaires, des tératocarcinomes et des lignées EC (Solter and Knowles 1978). Éventuellement, l'utilité de ces marqueurs a été reconnue pour la caractérisation des cellules ES (Artzt, Dubois et al. 1973).

L'AP a aussi longtemps été utilisée comme marqueur de cellules pluripotentes (Wobus, Holzhausen et al. 1984). Les études initiales sur l'utilité de AP dans ce contexte étaient basées sur son expression dans les tératomes de souris et d'humains, et plus tard dans l'ICM du blastocyste et dans les PGC murines (Berstine, Hooper et al. 1973; Benham, Andrews et al. 1981; MacGregor, Zambrowicz et al. 1995; Chazaud, Yamanaka et al. 2006). Malgré le fait qu'un rôle spécifique au maintien de l'état pluripotent n'ait pas encore été identifié pour AP, une corrélation claire entre l'état pluripotent des cellules ES humaines et l'expression de AP par celles-ci a tout récemment été établie (O'Connor, Kardel et al. 2008).

Avec l'avènement de méthodes moléculaires plus sophistiquées et une meilleure compréhension du rôle des gènes impliqués dans le maintien de l'état pluripotent, les marqueurs moléculaires ont prouvé leur utilité dans la caractérisation de lignées pluripotentes (Brivanlou, Gage et al. 2003). Pour certains marqueurs, comme dans le cas d'AP, aucune fonction particulière ne leur est associée, mais pour d'autres, un rôle fonctionnel dans le maintien de l'état pluripotent a clairement été démontré.

Un des premiers gènes à être utilisé à cet effet est Oct4, car il est exprimé non seulement de manière spécifique dans les embryons, les cellules germinales et les tissus pluripotents, mais de manière plus importante, il est essentiel à la dérivation et au maintien de cellules ES murines (Scholer, Balling et al. 1989; Pesce, Gross et al. 1998). Le gène Oct4 murin code pour une protéine à homéodomaine composée de deux sous-domaines, le domaine

spécifique Pit-Oct-Unc (POU<sub>S</sub>) et l'homéodomaine (POU<sub>HD</sub>), qui peuvent tous deux se lier à l'ADN de manière indépendante, ce qui confère à cette protéine une flexibilité de transactivation exceptionnelle (Pesce and Scholer 2001; Boiani and Scholer 2005). Lorsque ce gène est inactivé par recombinaison homologue, la formation du blastocyste est compromise à un tel point qu'aucun ICM n'est formé (Nichols, Zevnik et al. 1998). La dérivation de cellules ES possédant cette mutation n'est donc pas possible (Boiani and Scholer 2005). Dans les blastocystes, l'expression d'Oct4 se restreint à l'ICM à mesure que le développement progresse, et avant l'implantation, Oct4 devient rapidement exprimé dans les cellules en migration de l'endoderme primitif (PrE) naissant (Palmieri, Peter et al. 1994). Par ailleurs, lorsque le niveau d'Oct4 est réprimé dans les cellules ES, ces dernières se différencient en trophoctoderme (TE), tandis qu'une augmentation d'Oct4 résulte en une différenciation en PrE, démontrant ainsi un rôle important de ce gène dans la détermination du destin cellulaire chez la souris.

Le gène Nanog a été découvert de manière indépendante en 2003 par deux groupes (Chambers, Colby et al. 2003; Mitsui, Tokuzawa et al. 2003). Le gène Nanog code pour une protéine à trois domaines: un domaine N-terminal et un domaine C-terminal, qui tous deux possèdent une activité de transactivation, et un homéodomaine (Pan and Pei 2003). Ce facteur de transcription a d'abord été réputé maintenir l'état pluripotent de cellules ES indépendamment de la voie du LIF (Chambers, Colby et al. 2003). L'expression de l'ARN messager de Nanog débute dans les cellules situées à l'intérieur de la morula. Au cours du développement embryonnaire murin, l'expression de Nanog devient confinée à l'ICM du

blastocyste et est éteinte dans le TE (Pan and Thomson 2007). Par la suite, son expression est restreinte à l'épiblaste, mais est exclue du PrE, menant certains chercheurs à croire qu'un de ses rôles serait d'agir comme répresseur de ce lignage (Ralston and Rossant 2005). Suite à l'implantation du blastocyste, l'expression de Nanog disparaît et réapparaît plus tard dans le développement, dans les cellules germinales de la crête génitale (Chambers, Colby et al. 2003). Le développement d'embryons possédant une mutation d'inactivation de Nanog se déroule normalement jusqu'au stade blastocyste, mais ils ne forment pas d'épiblaste (Mitsui, Tokuzawa et al. 2003). À la différence des embryons mutés pour Oct4, des lignées de cellules ES peuvent quand même être dérivées en l'absence de Nanog, mais ces cellules ont tendance à se différencier en cellules du PrE in vitro (Mitsui, Tokuzawa et al. 2003). Une diminution du niveau d'expression de Nanog dans les lignées de cellules ES murines et humaines induit leur différenciation en lignages extraembryonnaires (Hyslop, Stojkovic et al. 2005; Hough, Clements et al. 2006).

Un autre gène d'importance pour le maintien de l'état pluripotent est nommé région déterminante du sexe-Y-domaine-2 (Sox2). Celui-ci code pour un facteur de transcription ayant un domaine de liaison à l'ADN du groupe à haute mobilité (HMG) (Fong, Hohenstein et al. 2008). Des expériences d'inactivation de Sox2 ont démontré que ce gène est requis pour le maintien de l'épiblaste (Avilion, Nicolis et al. 2003). Son expression débute au stade morula et est maintenue dans l'épiblaste, mais est aussi présente dans l'ectodème extraembryonnaire, et devient ensuite restreinte aux précurseurs de cellules neurales et germinales (Graham, Khudyakov et al. 2003). Lorsque la dérivation de cellules



ES est tentée à partir d'embryons dont le gène Sox2 a été inactivé, il en résulte des cellules du TE et du PrE plutôt que des cellules ES (Avilion, Nicolis et al. 2003). Sox2 est fortement exprimé dans les cellules ES murines et humaines, et une réduction de son niveau d'expression résulte en une plus grande propensité pour la différenciation (Chew, Loh et al. 2005). De plus, dans les cellules ES humaines, une réduction de Sox2 engendre une augmentation de marqueurs du TE, et une réduction des niveaux d'expression de Nanog et d'Oct4, indiquant un réseau de maintien de pluripotentialité entre ces trois facteurs (Fong, Hohenstein et al. 2008). En effet, une autre étude a démontré que ces trois facteurs de transcription peuvent activer ou réprimer l'expression d'un nombre considérable de gènes y compris plusieurs gènes codant pour des facteurs de transcription impliqués dans la régulation du développement (Boyer, Lee et al. 2005; Yu and Thomson 2008).

### **2.3 Les voies de signalisation impliquées dans le maintien de l'état pluripotent**

#### **2.3.1 Les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) et le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF)**

L'état pluripotent ne dépend pas seulement des facteurs intrinsèques énumérés ci-haut, il est aussi fonction de facteurs extrinsèques. Les études initiales portant sur les conditions de culture de cellules EC et ES murines favorisant l'état pluripotent avaient laissé entendre que les MEF jouaient un rôle important (Martin and Evans 1975; Martin, Wiley et al. 1977; Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Ce n'est qu'en 1987 que le rôle précis de ces

cellules a commencé a être élucidé, suite à une étude démontrant que les MEF pouvaient être remplacées par un milieu de culture conditionné sur des cellules de foie de rat Buffalo (Smith and Hooper 1987), ou par le LIF en absence de MEF (Smith, Heath et al. 1988; Williams, Hilton et al. 1988). Le maintien de l'état pluripotent par les MEF est attribué en grande partie à la signalisation intracellulaire par la voie du LIF (Stewart, Kaspar et al. 1992; Chambers and Smith 2004). Lorsque le LIF se lie à son récepteur (LIFR), ce complexe recrute le récepteur transmembranaire glycoprotéine 130 (gp130), formant ainsi un complexe trimérique (Zhang, Owczarek et al. 1997). Ceci mène à une série d'évènements se déroulant en aval, incluant la phosphorylation de résidus tyrosine et une dimérisation et translocation au noyau du transducteur de signal et activateur de transcription 3 (STAT3) (Chambers 2004). La présence de FBS de concert avec l'activation de STAT3 procurent les signaux nécessaires à l'auto-renouvellement dans l'état pluripotent de cellules ES murines (Ying, Nichols et al. 2003). La récente découverte que STAT3 se lie en amont du gène Nanog pourrait suggérer un lien entre l'activation de la voie du LIF et le maintien de l'état pluripotent par l'augmentation des niveaux de Nanog, mais ceci reste à confirmer (Suzuki, Raya et al. 2006).

### **2.3.2 La voie des MAPK**

La voie des kinases activées par des mitogènes (MAPK) est impliquée dans bon nombre de fonctions cellulaires dont la prolifération, la différenciation, la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose (Saba-El-Leil, Vella et al. 2003). Il a été remarqué que l'inhibition de

l'enzyme MAPK kinase (MAPKK ou MEK) promeut l'auto-renouvellement des cellules ES, ce qui suggère que l'activation des kinases 1 et 2 régulées par signaux extracellulaires (ERK1/2) impliquées dans cette voie pousse les cellules ES vers la différenciation (Burdon, Stracey et al. 1999; Smith 2001). Plus récemment, l'activation de la voie des MAPK et subséquemment de ERK1/2 par le facteur de croissance de fibroblastes 4 (FGF4) a été identifiée comme étant impliquée dans la sortie de l'état d'auto-renouvellement et le début de la différenciation dans les cellules ES murines (Kunath, Saba-El-Leil et al. 2007). L'inhibition de la voie des MAPK par le composé chimique PD98059 empêche la répression de Nanog et empêche la différenciation de cellules ES en PrE, ce qui indique que la voie des MAPK est impliquée dans les mécanismes du maintien de l'auto-renouvellement (Hamazaki, Kehoe et al. 2006). De plus, l'inhibition de ERK1/2 dans l'embryon murin pousse l'ICM à se différencier exclusivement en épiblaste et empêche la formation du PrE (Chazaud, Yamanaka et al. 2006; Silva and Smith 2008).

### **2.3.3 La voie des Wnt**

Chez les vertébrés, la famille des Wnt, nommée d'après deux gènes homologues chez la Drosophile, *wg* et *int*, est associée à l'embryogénèse ainsi qu'à la carcinogénèse (Schugar, Robbins et al. 2008). Cette famille de protéines hautement conservées est aussi impliquée dans la communication intercellulaire, la détermination du destin cellulaire, la morphogénèse et la différenciation (Wodarz and Nusse 1998; Yamaguchi 2001). La béta-

caténine est un des effecteurs agissant en aval de la voie dite canonique des Wnt qui, une fois activée, résulte en une translocation de la bêta-caténine au noyau, ce qui entraîne son interaction avec les facteurs de transcription facteur de cellules T/ Facteur promoteur des lymphoïdes (Tcf/Lef) pour activer la transcription de gènes cibles (Hecht and Kemler 2000). La kinase glycogène synthase 3 (GSK3) est un inhibiteur de cette voie, et l'activation de la voie des Wnt résulte en une inhibition de la GSK3 (Anneren 2008). Ceci a pour effet de maintenir l'état pluripotent autant des cellules ES humaines que murines (Sato, Meijer et al. 2004; Hao, Li et al. 2006; Ogawa, Nishinakamura et al. 2006). En effet, une étude indique que l'inhibition de l'enzyme GSK3 par le 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) favorise l'expression soutenue des facteurs de transcription Oct4 et Nanog, et que le phénotype indifférencié est maintenu en présence de FBS, indépendamment de la voie LIF/STAT3 (Sato, Meijer et al. 2004). La voie de Wnt/bêta-caténine est aussi importante dans le développement pour l'initiation de la ligne primitive au début de la gastrulation (Beddington and Robertson 1999). De plus, les embryons murins dont les gènes Wnt3 ou bêta-caténine sont inactivés ne forment pas d'endoderme ou de mésoderme, n'établissent pas d'axe antéro-postérieure et subissent un arrêt de développement avant la gastrulation (Haegel, Larue et al. 1995; Liu, Wakamiya et al. 1999; Huelsken, Vogel et al. 2000).

#### **2.4 Embryologie et identité des différents types de cellules souches dans l'embryon**

### **2.4.1 Embryologie et cellules souches de l'embryon**

Le développement embryonnaire chez les mammifères débute lors de la fécondation de l'ovule, ce qui mène à la formation du zygote qui est l'ultime cellule totipotente. Une succession de clivages a pour effet de segmenter l'embryon en blastomères, et le stade huit cellules chez la souris marque le début de la compaction (Dard, Breuer et al. 2008). À partir de ce stade, les blastomères se retrouvant à l'intérieur de l'embryon sont destinés à devenir l'ICM, tandis que les cellules séquestrées à l'extérieur sont destinées à devenir le trophoblaste (Johnson and Ziomek 1981). Une fois arrivé au stade de 32 cellules, une cavité remplie de fluide, le blastocœle, commence à se former, annonçant le début de la cavitation et de la formation de l'ICM (Nagy 2003). S'ensuit l'expansion du blastocœle durant laquelle s'établit une polarité. À une extrémité de l'embryon on retrouve l'ICM recouverte de TE polaire et à l'autre extrémité, le TE mural composant la majeure partie de l'embryon (Nagy 2003). Au jour 4 dpc, les cellules de l'ICM se trouvant en contact avec le blastocœle commencent à former le PrE (aussi appelé hypoblaste), et les autres cellules de l'ICM forment l'épiblaste (aussi appelé ectoderme embryonnaire), de sorte qu'à l'implantation du blastocyste dans l'utérus, l'embryon est déjà composé de trois lignages distincts possédant des destins cellulaires bien différents et mutuellement exclusifs (Rossant 2007). Ces trois lignages, le TE, le PrE et l'épiblaste/ICM sont aussi des sources de trois types de cellules souches de l'embryon (Rossant 2007).

Le TE, qui donnera lieu aux portions fœtales du placenta, fournit des signaux qui influencent le développement de l'embryon jusqu'à la gastrulation (Rossant 2007). Par exemple, le descendant direct des cellules du TE polaire, l'ectoderme extraembryonnaire, est impliqué dans le modelage de l'axe proximo-distale de l'épiblaste (Beck, Le Good et al. 2002). Un des gènes fréquemment utilisé comme marqueur, mais exerçant aussi une fonction majeure dans les cellules du TE, est l'homéodomaine de type caudal 2 (Cdx2) (Beck, Erler et al. 1995). En son absence, la formation d'un blastocoele est rarement observée, et les embryons murins dont Cdx2 est inactivé ne peuvent s'implanter (Chawengsaksophak, James et al. 1997). Le TE est aussi une source de cellules souches du trophoblaste (TS) (Tanaka, Kunath et al. 1998). Lorsque les cellules TS sont réintroduites dans l'embryon, elles contribuent exclusivement aux lignages trophoblastiques du placenta, mais pas aux tissus de l'embryon (Tanaka, Kunath et al. 1998).

Le PrE est le deuxième type cellulaire de l'embryon qui donnera lieu aux tissus extraembryonnaires. Déjà au jour 5 dpc chez la souris, le PrE a débuté sa différenciation en deux sous-types: L'endoderme viscéral et pariétal (Enders, Given et al. 1978). En début de gestation, ces deux tissus remplissent le rôle transitoire de placenta avant que ce dernier ne soit complètement formé (Dickson 1979; Kunath, Arnaud et al. 2005). L'endoderme viscéral joue un rôle non seulement dans la nutrition de l'embryon, mais aussi dans le modelage antérieur de l'embryon et la formation des îlots sanguins. (Lloyd, Beckman et al. 1998; Bielinska, Narita et al. 1999). Parmi les gènes marqueurs du PrE les plus utilisés pour la caractérisation, on retrouve Gata4 et Gata6 (Bielinska, Narita et al. 1999). L'inactivation

de Gata4 chez la souris entraîne une mortalité embryonnaire avant 9.5 dpc, et la mortalité embryonnaire survient entre les jours 5.5 et 7.5 dpc dans le cas de l'inactivation de Gata6. Chez les souris mutantes pour Gata4, le défaut est attribué à une malfonction du PrE (Molkentin, Lin et al. 1997), tandis que chez les souris mutantes pour Gata6, un retard du développement et un niveau d'apoptose élevé dans l'épiblaste sont observés (Morrisey, Tang et al. 1998; Koutsourakis, Langeveld et al. 1999). Une récente étude a décrit la dérivation d'un nouveau type de cellules souches, celles de l'endoderme extraembryonnaire (XEN) (Kunath, Arnaud et al. 2005). Lorsqu'injectées dans un blastocyste, les cellules XEN contribuent exclusivement à l'endoderme extraembryonnaire de chimères, en particulier à l'endoderme pariétal (Kunath, Arnaud et al. 2005).

L'ICM du blastocyste donne directement lieu à deux lignages, celui du PrE et celui de l'épiblaste (Niwa 2007). L'épiblaste et l'ICM sont tous deux considérés pluripotents grâce à leur capacité de donner lieu à toutes les cellules de l'embryon, mais ces deux tissus sont bien distincts (Gardner and Rossant 1979). Par exemple, chez la souris, l'épiblaste ne peut pas se différencier en TE, ni en PrE. Sa morphologie est épithéliale, contrairement à l'ICM (Gardner and Rossant 1979). Si on compare le potentiel de développement de ces deux tissus, l'épiblaste exhibe une pluripotentialité plus restreinte que celle de l'ICM, puisqu'il a perdu la capacité de donner lieu aux tissus extraembryonnaires (Niwa 2007).

#### **2.4.2 La provenance des cellules ES dans l'embryon**

Les cellules ES ont longtemps été considérées comme le penchant in vitro de l'épiblaste (Smith 2001). D'autres se sont interrogés sur la possibilité qu'elles constitueraient plutôt une sorte d'artéfact de la culture in vitro; un type cellulaire équivalent dans l'embryon n'existerait peut-être pas (Zwaka and Thomson 2005). De récentes études très intéressantes ont commencé à apporter quelques réponses quant à l'identité possible des cellules ES. Pour examiner la possibilité que les cellules ES soient en fait le penchant in vitro de l'épiblaste, deux équipes ont dérivé des lignées de cellules pluripotentes directement à partir de l'épiblaste murin en utilisant des conditions de culture normalement réservées aux cellules ES humaines (Brons, Smithers et al. 2007; Tesar, Chenoweth et al. 2007). Une de ces équipes a aussi utilisé et examiné les épiblastes de rat (Brons, Smithers et al. 2007). Outre le fait qu'elles proviennent de tissus de rongeurs, les lignées de cellules souches de l'épiblaste (EpiSC) ont plusieurs caractéristiques en commun avec les cellules ES de souris qui proviennent de l'ICM du blastocyste. Elles ont une capacité de différenciation in vitro vers les trois feuilletts germinatifs et en EB, et peuvent également former des tératomes in vivo lorsqu'introduites sous la peau de souris immunodéficientes (Brons, Smithers et al. 2007; Tesar, Chenoweth et al. 2007). Par contre, les cellules EpiSC ont aussi plusieurs caractéristiques en commun avec les cellules ES humaines; elles ne dépendent pas du LIF mais requièrent plutôt l'activine comme facteur de croissance pour maintenir l'état pluripotent, et ont une morphologie s'apparentant aux cellules ES humaines (Eggen 2007). Un fait à noter est que lors d'injection ou d'agrégation avec des embryons de stade pré-



implantation, les cellules EpiSC ne contribuent pas aux tissus de l'embryon (Brons, Smithers et al. 2007; Tesar, Chenoweth et al. 2007). Ces études ont tout de même mené certains chercheurs à se demander si ce sont les conditions de cultures ou bien le tissu à l'origine des lignées établies qui contribue au phénotype observé. Lorsque des lignées ont été établies cette fois à partir de l'ICM murin, mais en utilisant les mêmes conditions de culture que les cellules EpiSC et cellules ES humaines, ces cellules souches exprimaient des marqueurs de pluripotentialité tels qu'Oct4, Nanog et Sox2, mais ne pouvaient se différencier in vitro ni in vivo, sauf si elles étaient stimulées avec du LIF et avec d'autres facteurs retrouvés dans le FBS (Chou, Chen et al. 2008). Tous ces indices mènent à croire que l'identité exacte des cellules ES, non seulement chez la souris mais aussi chez les autres espèces, ainsi que leur provenance in vivo, demeurent encore des questions ouvertes et sans réponses définitives pour l'instant.

#### **2.4.3 Équivalence des tissus de l'embryon et des lignées établies**

Il est important de noter que le potentiel de développement des cellules provenant directement de l'embryon et celui des cellules provenant de lignées établies n'est pas nécessairement toujours équivalent. Des études ayant pour but de comparer le potentiel de développement de cellules d'ICM et de cellules ES ont démontré que les cellules d'ICM demeuraient exclues du TE suite à une injection dans les embryons de stade huit cellules ou blastocyste, mais que les cellules ES pouvaient parfois contribuer au PrE et au TE

(Beddington and Robertson 1989). Il est connu que l'interconversion des précurseurs du TE et de l'ICM est encore possible au stade morula avancée et de jeune blastocyste (Rossant and Vijn 1980; Gardner 1985). De plus, les cellules ES peuvent elles aussi générer du TE sous des conditions spécifiques (Niwa, Miyazaki et al. 2000; Niwa, Toyooka et al. 2005). Mais à toutes fins pratiques, les cellules ES murines ne sont pas réputées contribuer au trophoblaste in vivo (Ralston and Rossant 2005). Les cellules de l'épiblaste, lorsqu'isolées à partir de l'embryon murin au jour 6 dpc, ne peuvent plus coloniser le blastocyste ni contribuer aux tissus embryonnaires, malgré le fait que l'épiblaste lui-même soit à l'origine de tous les tissus embryonnaires (Gardner and Brook 1997). Dans ce contexte, le comportement in vivo des cellules isolées de l'épiblaste ressemble à celui des lignées de cellules EpiSC, et non pas à celui des cellules de l'épiblaste in situ. Quoique des expériences équivalentes n'aient jamais été effectuées chez l'humain pour des raisons évidentes d'éthique, le fait que les cellules ES maines génèrent spontanément et facilement du TE in vitro est bien connu (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998; Xu, Peck et al. 2005).

## **2.5 Méthodes d'évaluation de la capacité de développement**

Ce qui distingue les cellules ES des autres types de cellules souches est non seulement leur origine dans l'embryon, mais surtout leur capacité de développement, la pluripotentialité, qui est évaluée de plusieurs façons.

### **2.5.1 Différenciation in vitro**

Les cellules ES possèdent une étonnante capacité de se différencier en tous les types cellulaires en culture in vitro (Keller 1995; Smith 2001). Différents protocoles ont été élaborés au courant des 20 dernières années pour induire la différenciation des cellules ES en cellules représentatives des trois feuillets germinatifs in vitro (Keller 2005). Trois façons de procéder sont généralement utilisées pour induire la différenciation des cellules ES. Les trois méthodes impliquent la culture en l'absence des facteurs permettant le maintien de l'état indifférencié (cellules nourricières, LIF ou autre facteurs). La première méthode consiste à cultiver les cellules en suspension et permettre leur agrégation pour former des colonies hétérogènes de cellules différenciées, appelées cellules EB (Martin and Evans 1975; Martin, Wiley et al. 1977). La culture en agrégation permet aux cellules ES de récapituler leur programme de développement, mais de façon désordonnée, puisqu'il n'y a pas d'organisation axiale (Doetschman, Eistetter et al. 1985). La différenciation in vitro et l'expansion des cellules différenciées est complétée en permettant aux EB de s'attacher et de proliférer à la surface d'un Pétri. L'addition d'acide rétinoïque peut être utilisée pour induire un biais dans la direction de la différenciation, notamment vers les cellules neuronales (Rohwedel, Guan et al. 1999; Andrews 2002). Une autre approche consiste à cultiver les cellules ES en contact avec des cellules stromales (Nakano, Kodama et al. 1994), ou avec différentes protéines de la matrice extracellulaire (Nishikawa, Nishikawa et al. 1998), ce qui induit leur différenciation. Des protocoles visant à induire la différenciation in vitro en

types cellulaires spécifiques ont été développés par plusieurs groupes, principalement chez la souris. Il est maintenant possible d'induire de façon dirigée la différenciation en ajoutant des facteurs de croissance ou cytokines spécifiques pour générer des cellules hématopoïétiques, cardiaques et hépatiques (Keller 2005). Pour plusieurs autres types cellulaires cependant, on ne peut qu'obtenir des phénotypes immatures qui ne peuvent pas être utilisés tels quels en médecine régénératrice (Keller 2005). Non seulement ces tests de différenciation in vitro sont utiles pour évaluer le potentiel de développement des cellules ES, mais ils sont à la base de la médecine régénératrice, peuvent contribuer à évaluer de nouvelles substances thérapeutiques, et peuvent contribuer à élargir nos connaissances fondamentales en biologie du développement, spécialement chez les espèces ou les embryons ne sont peu ou pas accessibles pour la recherche, notamment chez l'humain.

### **2.5.2 Formation de tératomes**

Les tératomes sont définis comme étant des tumeurs non malignes contenant des cellules originaires des trois feuillets germinatifs embryonnaires (Damjanov and Andrews 2007). Lorsque xéno greffées dans des souris immunodéficientes, les cellules ES ont la capacité de se différencier en tératomes, ce qui démontre leur pluripotentialité (Solter 2006). L'identité des types cellulaires est généralement vérifiée en évaluant l'histologie des tumeurs. L'habileté de former des tératomes est partagée également par les cellules EC et les cellules germinales (Smith 2001). Pour certaines espèces chez lesquelles on doit évaluer la pluripotentialité mais où l'utilisation d'embryons est à proscrire, notamment chez l'humain,

la formation de tératomes est la méthode de choix pour évaluer le potentiel *in vivo* de développement (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). Cependant, la technique de formation de tératomes ne permet pas d'évaluer précisément la contribution des cellules ES à la lignée germinale.

### **2.5.3 Le chimérisme embryonnaire et la contribution à la lignée germinale**

Chez la souris, le test le plus approprié pour évaluer la pluripotentialité des cellules ES est la transmission par la lignée germinale (Jaenisch and Young 2008). Une méthode communément utilisée afin d'évaluer la contribution des cellules ES à la lignée germinale *in vivo* consiste en la création d'une chimère embryonnaire en injectant des cellules ES à l'intérieur de la cavité d'un blastocyste, en utilisant une pipette de verre étirée sous le microscope (Bradley 1987; Nagy 2003). Les cellules ES pluripotentes injectées dans le blastocyste peuvent se différencier en tous les types cellulaires embryonnaires, incluant les cellules germinales (Hogan 1994).

L'agrégation de cellules ES avec un embryon hôte est une deuxième méthode pour produire des chimères pour évaluer le potentiel de développement *in vivo* et la capacité des cellules ES de contribuer à la lignée germinale. L'embryon hôte est mis en contact dans un puits avec des cellules ES pour qu'une agrégation se produise en l'absence de la zone pellucide. Un protocole efficace pour créer des agrégats ES-hôte est décrite par Nagy (Nagy, Rossant et al. 1993). Dans ces études, des embryons tétraploïdes ont été utilisés comme hôtes pour

améliorer l'efficacité de contribution des cellules ES à l'embryon. Les embryons tétraploïdes gardent la capacité de s'implanter et de former les tissus extraembryonnaires, mais forment rarement des structures embryonnaires (Snow 1975; Snow 1976; Tarkowski, Witkowska et al. 1977). Les fœtus obtenus suite à l'agrégation de cellules ES avec des embryons tétraploïdes peuvent ainsi être entièrement composés des cellules ES (Nagy, Gocza et al. 1990). De cette façon, il est possible d'évaluer efficacement la contribution des cellules ES à tous les types de tissus, y compris la lignée germinale. Il est ensuite possible de retracer l'origine des cellules dans les chimères grâce à la caractérisation par microsatellites, ou à des marqueurs préalablement insérés dans les cellules ES tels que la protéine fluorescente verte (GFP) (Tam and Rossant 2003).

## **2.6 Applications des cellules ES chez les souris**

### **2.6.1 L'inactivation de gènes par recombinaison homologue**

Bradley et al (Bradley, Evans et al. 1984) fût le premier groupe à démontrer la capacité de colonisation de la lignée germinale par les cellules ES lorsqu'injectées dans un blastocyste de souris. Cette propriété des cellules souches a ouvert la porte à l'utilisation des cellules ES comme outils pour introduire des mutations ciblées dans la lignée germinale. Capecchi (Thomas and Capecchi 1987) a introduit une mutation ciblée par recombinaison homologue dans les cellules ES pour la première fois, et Thompson (Thompson, Clarke et al. 1989) a démontré la transmission d'une telle mutation ciblée par recombinaison homologue dans la

lignée germinale de chimères produites à l'aide de cellules ES. La capacité d'auto-renouvellement et la rapidité de prolifération des cellules ES en font un outil idéal pour la transformation génétique ciblée par recombinaison homologue. Pour inactiver un gène par recombinaison homologue dans les cellules ES, il s'agit d'y insérer un fragment d'ADN qui correspond à la séquence mutée du gène d'intérêt, flanqué de séquences homologues au gène d'intérêt. Le fragment inséré se pariera à la séquence ciblée d'ADN et la séquence mutée remplacera la séquence normale par recombinaison homologue dans une cellule-fille lors de la division des cellules ES. Les cellules ES ainsi modifiées sont injectées dans un blastocyste de type sauvage pour produire un animal dont la lignée germinale est chimérique. Suite à des accouplements répétés entre ces chimères, il est possible d'obtenir un animal dont les deux allèles d'un gène d'intérêt sont inactivés dans toutes les cellules de l'organisme. Il est à noter qu'il est également possible de produire des souris dont un gène a été ajouté ou remplacé par un autre avec la même technique.

Il est maintenant possible de produire des animaux dans lesquels un gène peut être inactivé sélectivement par recombinaison homologue dans un ou des tissus spécifiques. Un système communément employé pour produire ce genre d'animal est le système *Cre-loxP* (Gu, Zou et al. 1993). La recombinase Cre excise les sites loxP flanquant une séquence d'ADN (Kuhn and Schwenk 1997). Pour inactiver un gène de cette façon, une souris exprimant la recombinase Cre sous le contrôle d'un promoteur exprimé spécifiquement dans le tissu d'intérêt (Orban, Chui et al. 1992) est croisée à une souris dont la séquence du gène d'intérêt est flanquée de séquences loxP par recombinaison homologue. Dans l'animal de la

génération suivante, la recombinaise Cre, exprimée seulement dans le tissu d'intérêt, coupe la séquence aux sites loxP pour créer une délétion du gène d'intérêt. On peut ainsi étudier la fonction d'un gène dans un tissu donné, sans l'interférence de l'effet de l'inactivation du gène sur les autres tissus de l'organisme. D'autres systèmes d'inactivation inductible de gènes ont été développés, notamment le système inductible par la tétracycline (Bockamp, Maringer et al. 2002), pour pouvoir choisir le moment où l'inactivation du gène sera induite durant le développement.

La technique de mutation par recombinaison homologue possède un net avantage sur les techniques de transgénèse conventionnelles étant donné que l'insertion de la séquence dans l'ADN ne se fait pas au hasard, et que le site d'insertion du gène étranger est unique. Les gènes normaux ne sont pas affectés, et l'intensité d'expression du transgène ne varie pas en fonction du site d'insertion. De plus, la transgénèse conventionnelle ne permet pas d'inactiver complètement un gène (Bockamp, Maringer et al. 2002). Il est envisageable que la technologie de recombinaison homologue dans les cellules ES pourrait être utile à la correction de défauts génétiques dans les cellules souches humaines, qui pourraient ensuite être utilisées en thérapie cellulaire.

### **2.6.2 Les modèles murins de maladies humaines**

Les animaux dont un ou plusieurs gènes sont inactivés par recombinaison homologues ont été très utiles pendant les 25 dernières années pour élucider la fonction de gènes dans



l'organisme. Plusieurs domaines de la recherche scientifique ont profité de cette technologie. La technologie d'inactivation ciblée de gène par recombinaison homologue a également contribué à la médecine par la création de modèles murins de maladies humaines. Par exemple, parmi les premiers modèles, ont compte celui de la fibrose kystique et de la dystrophie musculaire (Bockamp, Maringer et al. 2002).

Cependant, seulement que de rares maladies chez l'humain résultent d'une inactivation d'un seul gène. La plupart des maladies génétiques résultent d'une mutation qui affecte la fonction du gène. Il est possible également de produire des mutations simples avec la technologie de la recombinaison homologue pour étudier ces maladies (Cohen-Tannoudji and Babinet 1998; Sauer 1998).

L'inactivation de gènes par recombinaison homologue a permis également des percées dans le domaine de sélection de nouveaux composés pharmaceutiques. Par exemple, les souris dont le gène codant pour une enzyme importante du métabolisme a été inactivé par recombinaison homologue, a pu être utilisée pour tester l'effet toxique et carcinogène de nouveaux composés pharmaceutiques sur l'organisme (Guengerich and Shimada 1991).

## **2.7 Le rat comme modèle**

### **2.7.1 Avantages que présente le rat comme modèle de recherche**

Bien que la souris ait un avantage pour les études génétiques, elle présente toutefois des inconvénients incontournables. Les réponses aux composés pharmacologiques ou toxicologiques observées chez les souris sont souvent différentes des réponses observées chez l'homme, ce qui fait qu'on doit bien évaluer la validité des études précliniques conduites chez la souris. Par exemple, une souris dont le gène antigène de leucocyte humain-B27 (HLA-B27) associé à des maladies auto-immunes humaines a été inactivé ne développe aucune pathologie (Taurog, Lowen et al. 1988). Cependant, les rats transgéniques pour ce gène développent une pathologie similaire à celle de l'humain (Hammer, Maika et al. 1990). Le développement de nouveaux modèles animaux en recherche biomédicale est de plus en plus attendu.

Depuis 150 ans, le rat a été un modèle de choix pour la recherche en physiologie, pharmacologie, toxicologie, nutrition, comportement, immunologie et cancer (Jacob 1999). Une banque de données exhaustive a été générée dans les domaines du diabète, des maladies neurodégénératives, des maladies cardiovasculaires et du comportement. De telles informations détaillées ne sont pas disponibles chez la souris.

Le rat, par sa taille et la taille de ses organes, présente un avantage par rapport à la souris pour l'étude de la physiologie, et des essais de nouveaux composés pharmacologiques ou toxicologiques (Gill, Smith et al. 1989). Les rats transgéniques sont d'autant plus faciles à analyser que la souris par la taille et la fréquence de prélèvement des échantillons (Tesson, Cozzi et al. 2005).

### **2.7.2 La situation actuelle: exemples et limitations de l'utilisation du rat**

Plus de 1000 souches, sous-souches ou rats génétiquement modifiés ont été créées à ce jour (Aitman, Critser et al. 2008). Les ressources génomiques accessibles chez le rat sont impressionnantes, on n'a qu'à penser au Rat Genome Database. Une importante base d'information concernant les loci de traits quantitatifs (QTL) et les courts polymorphismes de nucléotides (SNP) de différentes souches chez le rat a été construite à travers des années de recherche. De plus, la séquence du rat Brown Norway (BN) a été élucidée récemment avec les technologies de séquençage de génome. De nouveaux outils génétiques se développent, tels que des plateformes commerciales de micropuces pour les séquences codantes ou les ARN d'interférence courts (siRNA); une récente revue compréhensive des ressources disponibles chez le rat est dressée par Aitman et collègues (Aitman, Critser et al. 2008).

Depuis quelques années, avec le développement des ressources génomiques chez le rat, il est devenu possible d'identifier des gènes impliqués dans des traits complexes chez le rat, ayant une implication dans certaines maladies humaines telles que la neuroinflammation (Swanberg, Lidman et al. 2005), la glomérulonéphrite (Aitman, Dong et al. 2006; Behmoaras, Bhangal et al. 2008), le cancer du sein (Samuelson, Hesselson et al. 2007), la défaillance cardiaque (Monti, Fischer et al. 2008), et la masse ventriculaire gauche (Petretto, Sarwar et al. 2008). De telles informations sur les traits complexes chez la souris ne sont encore une fois pas répertoriées.

Les méthodes actuelles utilisées pour modifier le génome des rats incluent la transgénèse traditionnelle qui consiste à injecter la construction génique dans le zygote au stade pronociaux et à transplanter les embryons dans l'oviducte d'une mère porteuse pour obtenir un animal transgénique (Tesson, Cozzi et al. 2005), le transfert d'ADN dans l'embryon médié par vecteurs viraux (van den Brandt, Wang et al. 2004), le transfert d'ADN dans les spermatozoïdes (Dozortsev, Wakaiama et al. 1998; Kato, Ishikawa et al. 2004; Hirabayashi, Kato et al. 2005) et l'interférence d'ARN, méthode qui permet d'atténuer l'expression d'une protéine en inactivant son ARN par interférence avec un brin d'ARN anti-sens homologue (Dann 2007; Young-Pearse, Bai et al. 2007). D'autres méthodes plus laborieuses sont aussi utilisées, telles que la mutagenèse chimique par le N-ethyl-N-nitrosouréa (ENU) et la mutagenèse insertionnelle qui fait usage de transposons capturant des gènes (Aitman, Critser et al. 2008).

Quant aux essais de clonage de cellules génétiquement modifiées chez le rat pour la création de modèles transgéniques aucun cas de recombinaison homologue n'a encore été démontré (Hayes, Galea et al. 2001; Roh, Guo et al. 2003; Zhou, Renard et al. 2003; Popova, Bader et al. 2006; Yoo, Demers et al. 2007). Cette technique est peu efficace, en partie du à l'activation spontanée des ovocytes du rat. En somme, malgré l'abondance des ressources sur le génome du rat, il existe un manque criant d'outils pour manipuler le génome du rat de manière ciblée.

### **2.7.3 Études antérieures sur les ES chez le rat**

Malgré les progrès réalisés pour générer des modèles de rat transgéniques, aucune de ces approches n'a été en mesure d'offrir la possibilité de manipuler le génome du rat de manière ciblée. La dérivation de cellules ES suffisamment pluripotentes pour permettre la contribution aux gamètes chez le rat est donc souhaitable afin d'exploiter la technologie du ciblage de gènes développée chez la souris. La première publication traitant ce sujet en particulier avait laissé entendre que des lignées de cellules ES chez le rat avaient été obtenues, et que ces dernières étaient pluripotentes car elles pouvaient contribuer aux multiples tissus embryonnaires de chimères (Iannaccone, Taborn et al. 1994). Par contre, des vérifications subséquentes ont démontré que les cellules pluripotentes ayant contribué aux chimères n'étaient pas des cellules ES de rat, mais bien des cellules ES de souris qui avaient contaminé les cultures (Brenin, Look et al. 1997). Des lignées de cellules dérivées à

partir de l'ICM chez le rat et possédant une activité AP ainsi qu'une expression du marqueur SSEA-1 ont été annoncées peu après (Ouhibi, Sullivan et al. 1995). Cependant, leur longévité en culture in vitro était limitée à quatre passages, après lesquels ces cellules cessaient de proliférer, limitant ainsi les possibilités de vérifier leur potentiel de différenciation (Ouhibi, Sullivan et al. 1995). Des lignées pouvant être cultivées à long terme ont ensuite vu le jour, et des études examinant les effets des cytokines de la famille du LIF sur leur prolifération ont pu être menées (Vassilieva, Guan et al. 2000). L'avènement de marqueurs moléculaires caractérisant l'état pluripotent comme Oct4 a permis aux auteurs de démontrer pour la première fois l'expression de l'ARN de ce facteur de transcription dans des lignées de cellules RESL (Vassilieva, Guan et al. 2000). Le potentiel de différenciation in vitro et in vivo n'a toutefois pas été examiné. Une autre étude semblable a fait état d'une lignée de cellules d'endoderme pariétal dont le potentiel de différenciation n'est pas connu, dérivée à partir du blastocyste chez le rat et exprimant SSEA-1 mais n'ayant pas d'activité AP (Notarianni and Flechon 2001). Cette lignée pouvait être maintenue en culture sur de longues périodes soit sous forme de monocouche épithéliale sur MEF ou en agrégats en suspension. La culture en suspension induisait la formation d'une matrice extracellulaire centrale dans les agrégats, qui ressemblaient aux EB formé par les cellules ES murines différenciées (Notarianni and Flechon 2001).

La première étude à examiner le comportement de cellules RESL in vivo impliquait leur utilisation comme agent inducteur de tolérance immunologique pour des études de transplantation, et une caractérisation in vitro limitée a été effectuée (Fandrich, Lin et al.

2002). Un des concepts à ressortir de cette étude a été l'observation que l'efficacité de dérivation de lignées de cellules RESL dépendait du patrimoine génétique des embryons (Fandrich, Lin et al. 2002). La capacité de différenciation in vitro de ces cellules a été examinée par la suite, et a démontré que des cellules RESL n'exprimant pas Oct4 pouvaient tout de même se différencier en cellules neuronales, hépatiques, gliales, et endothéliales (Ruhnke, Ungefroren et al. 2003). Aucune mention de la capacité de développement in vivo de ces cellules n'a cependant été notée. Une autre équipe a tenté de comprendre ce qui arrivait aux embryons de rat explantés en culture en examinant l'expression du marqueur Oct4 dans les explants primaires de blastocystes (Buehr, Nichols et al. 2003a). Malgré le fait que les lignées obtenues n'exprimaient pas Oct4, elles pouvaient être maintenues en culture durant de longues périodes. Ces auteurs ont noté une diminution et perte rapide d'Oct4 dans les explants primaires, et les lignées dérivées pouvaient se différencier in vitro en cellules extraembryonnaires, mais aucune contribution n'a été démontrée in vivo (Buehr, Nichols et al. 2003a).

L'information accumulée sur les traits complexes chez le rat combinée à la technologie d'inactivation de gènes par recombinaison homologue dans les cellules ES pourrait ouvrir la porte à nombre de nouvelles découvertes dans plusieurs domaines de la recherche biomédicale. Cet ouvrage, dans lequel les trois manuscrits composent les parties expérimentales, se consacre à l'élaboration de méthodes pour la dérivation et la caractérisation in vitro et in vivo de lignées de cellules ES chez le rat.

**3.0 ARTICLE PREMIER****Rat embryonic stem-like (ES-like) cells can contribute to  
extraembryonic tissues in vivo**

Simon-Pierre Demers<sup>\*†</sup>, Jae Gyu Yoo<sup>\*†</sup>, Li Lian<sup>†</sup>, Jacinthe Therrien<sup>\*</sup>, Lawrence C. Smith<sup>\*†‡</sup>

<sup>\*</sup>Centre de recherche en reproduction animale (CRRA), Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada J2S 7C6, <sup>†</sup>Clonagen Inc., St-  
Hyacinthe, QC, Canada J2S 8W2

<sup>‡</sup>Corresponding author: Dr. Lawrence C. Smith

Centre de recherche en reproduction animale

Faculté de médecine vétérinaire

Université de Montréal

Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

████████████████████

████████████████

██

**Running head: In vivo contribution of rat ES-like cells**



### 3.1 ABSTRACT

Despite significant advances achieved through gene targeting in mouse embryonic stem (ES) cells, this technology is presently only available in mice. Since the rat is a species of undeniable importance to biomedical research, attempts at derivation of rat ES cell lines have been ongoing for many years, however the putative rat ES cell lines which have been reported to date have not yet displayed the ability to contribute *in vivo* to developing tissues following embryo injection. In contrast to previous studies, we describe herein the successful derivation and characterisation of rat ES-like cell lines that not only express markers of undifferentiated cells, alkaline phosphatase (AP) activity and stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) cell surface antigen, but also retain expression of *Oct4* (also known as *Pou5f1*) a homeodomain transcription factor and molecular marker of pluripotent cells. Notably, these rat ES-like cells, when injected into blastocysts transferred to pseudopregnant females, can contribute to developing extraembryonic tissues. This report demonstrates for the first time that rat ES-like cells can be derived efficiently, can express a panel of pluripotent cell markers, can be genetically modified *in vitro* and cryopreserved, and importantly, are capable of contributing to extraembryonic tissues *in vivo*.

### 3.2 INTRODUCTION

The laboratory rat *Rattus norvegicus* provides an important model for biomedical research and its applications in human health and the pathobiology of disease. From addiction to autoimmune diseases, from behavior to blood diseases, from cardiovascular diseases to cancer, from physiology to pharmacology, the use of numerous rat strains as experimental models has contributed significantly to our understanding of the mechanisms underlying normal and pathological human function (Gill et al., 1989; Jacob, 1999). A reverse genetics approach, best represented by the ES cell-based mouse knockout model, is currently unavailable for the rat. Indeed, in contrast to its fundamental position in physiological investigation, at functional genetic studies the rat lags far behind the mouse due to the absence of functional germline-competent rat ES cells that would allow gene-targeting as well as access to the germline of this species. There are no published reports of successful transfection of rat ES-like cells with exogenous DNA, of antibiotic selection of transfected cells, of transgene expression and appropriate freezing/thawing schemes, all of which are essential prerequisites for the genetic manipulation of the rat.

Besides the technical considerations mentioned above, several biological hurdles have yet to be overcome in the development of genuine rat ES cells. There are no reports that describe *in vivo* contribution of rat ES-like cells to developing embryonic (nor extraembryonic) tissues, a feature that is critical for demonstrating the true pluripotent character of ES cell lines. An overview of the literature of attempts at ES cell derivation in the rat and other species, and even ES cell derivation in mouse inbred strains, reveals a

unanimous lack of information explaining why no ES cell lines, defined by their ability to colonize the germline, exist in species other than mice and chicken (Wobus et al., 2005; Keefer et al., 2007). Perhaps intrinsic biological differences between rats and mice account for species-to-species variation in derivation of ES cells. For example, the rat epiblast (the pluripotent descendant of the inner cell mass or ICM) retains the ability to generate extraembryonic endoderm, a capacity that the mouse epiblast at the equivalent time of development no longer possesses, at least *in vitro* (Nichols et al., 1998). Furthermore, a striking *in vivo* difference between the mouse and rat is clearly illustrated when isolated rat epiblasts are transplanted under the kidney capsule of isogenic adult males. These isografts result in the formation of benign teratomas which, in nearly half of all cases when allowed to develop for long periods, display characteristics not of teratocarcinoma, as is the case when the exact same experiment is performed in mice, but rather of malignant yolk sac carcinoma (Knezevic et al., 2005). Incidentally, mouse teratocarcinomas are germ cell tumors whereas rat yolk sac carcinomas are of extraembryonic origin (Sobis et al., 1993; Brenin et al., 1997), which may suggest a bias of rat pluripotent tissues to preferentially differentiate into extraembryonic tissues *in vivo*, at least when grafted ectopically.

Previous attempts at derivation of rat ES-like cells have not shown fully characterised cells *in vitro* with respect to ES cell marker expression, including the presence of the POU-domain germline-specific transcription factor *Oct4* (both mRNA and protein) as well as SSEA-1 cell surface antigen and AP activity. Some authors have observed that rat blastocysts and blastocyst-derived cell lines rapidly downregulate the expression of *Oct4* soon after being placed in culture conditions that support the derivation of mouse ES cells

of the 129 strain (Buehr et al., 2003a). These authors reported that the lack of pluripotency of their rat embryonic cell lines could be due to the fact that they were *Oct4*-negative. However, no assessment of the extent of colonization of their cells to developing tissues *in vivo* was mentioned except to say that no contribution to fetal germ layers was observed. Herein we describe the development of the first rat ES-like cell line that expresses a panel of pluripotent cell markers and has the capacity to contribute to the formation of extraembryonic tissue following injection into blastocysts and embryo transfer.

### 3.3 MATERIALS AND METHODS

#### 3.3.1 Animals, derivation and culture of rat ES-like cell lines.

Rats of Sprague-Dawley (SD), Brown Norway (BN) and Fischer (F344) strains were purchased from Charles River Canada and kept on a 14 hour light 10 hour dark regime with food and water *ad libitum*. All animal procedures were performed according to protocols approved by the Comité d'éthique de l'utilisation des animaux, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. Vaginal smears were carried out to determine the estrous cycle stage of females. The presence of spermatozoa in the vaginal smears at noon the day after mating was designated 0.5 days post-coitum (dpc). The genetic background was varied by mating males of SD, BN or F344 background with females of SD, SD/F344, or F344 background, as indicated in Table 1. Derivation of rat ES-like cell lines was carried out according to the procedures used in mouse ES cell line derivation as described (Hogan,

1994). In all cases, a mitomycin C-treated mouse embryonic fibroblast (MEF) monolayer was used for both derivation and long-term culture. Rat blastocysts were collected by uterine flushing using DMEM supplemented with 10% charcoal-treated FBS (Gibco, Burlington, ON) and 25mM hepes buffer between 4 and 5 dpc and cultured 4 to 6 days before disaggregation of the inner cell mass (ICM). Resulting outgrowths were passaged mechanically every three days without trypsin, since trypsin was found to result in extensive differentiation of rat ICM-derived cells. The culture medium used is very similar to that used in the culture of mouse ES cells and has been described previously (Baqir et al., 2003), with the following slight modifications: Briefly, it comprises Knockout DMEM supplemented with 10% v/v Knockout Serum Replacement and 10% charcoal treated FBS, 0.5% penicillin-streptomycin, 1% each of nucleosides, L-glutamine, and non-essential amino acids (all from Gibco), 0.1mM  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma) and 2,000 U/mL ESGRO (Chemicon International).

### **3.3.2 In vitro characterisation, vector construction, transfection and selection of rat ES-like cells.**

All ES cell markers used in this study were first tested on and found to react positively with mouse R1 ES cells (Nagy et al., 1993). Alkaline phosphatase staining and SSEA-1 (Chemicon, 1:50) immunostaining were carried out according to the manufacturer's instructions with minor modifications. Briefly, cells were fixed with 100% ice-cold methanol for 10 minutes instead of 4% paraformaldehyde/PBS, and the first antibody was incubated overnight at 4°C instead of one hour at room temperature. All other

steps followed were identical to the manufacturer's protocol. All immunocytochemical stainings were carried out with simultaneous negative control stainings under identical conditions, with the exception that the first antibody was omitted in the negative controls. *Oct4* immunostaining was performed using a mouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, 1:50) using the same protocol as described above. For reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis, total RNA was isolated using the RNeasy Micro kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and treated with DNase prior to reverse-transcription with Superscript II RNase H (Invitrogen Canada) according to the manufacturer's instructions. One twentieth of the reverse transcription product was used in each PCR reaction to detect the presence of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapd*) and octamer-binding transcription factor 4 (*Oct4*) transcripts. The primers used were as follows: *Gapd* (forward: 5'-GTCCATGCCATCACTGCCAC-3' and reverse: 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3', 261bp). *Oct4* (forward: 5'-CGAGGAGTCCCAGGACATGAAA-3' and reverse: 5'-TGGGGGCAGAGGAAAGGATACA-3', 550bp). The suitability of these primers for amplifying transcripts of both mouse and rat origin was verified by using positive control cDNAs from R1 mouse ES cells and rat blastocysts, respectively. The pCMV/ $\beta$ actin/EYFP-Nuc vector was constructed as follows: Enhanced yellow fluorescent protein plasmid (pEYFP-Nuc) was purchased (BD Biosciences – Clontech, Palo Alto, California, USA). Restriction digestion of the plasmid was performed to excise the entire existing cytomegalovirus (CMV) enhancer element and promoter. The CMV-immediate early (IE) enhancer was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from pEYFP-Nuc and ligated

into the *Pst* I site of ppollIII $\beta$ actinGFP (obtained from Dr. M.-A. Sirard, Université Laval, Québec, Canada). The resulting hybrid CAG (CMV enhancer/chicken  $\beta$ -actin promoter) fragment was ligated into the blunted *Vsp* I (*Ase* I) and *Nhe* I sites of pEYFP-Nuc to obtain the final pCMV/ $\beta$ actin/EYFP-Nuc vector, which was verified both by restriction digestion and sequencing. Transfection of the rat ICM17 cell line with the pCMV/ $\beta$ actin/EYFP-Nuc vector was carried out using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Canada) as described in the manufacturer's instructions with the exception that cells were not trypsinized but passaged mechanically. Selection of transfected cells was carried out using G418 at a concentration of 100  $\mu$ g/ml and applied over a period of 30 days.

### 3.3.3 Blastocyst injection and embryo transfer.

The procedure used for blastocyst injection was as described (Eggan et al., 2001) with the following modifications: The manipulation medium was the same as that used for the culture of rat ES-like cell lines, rat diploid host blastocysts from F344 x SD/F344 matings were injected with 10-15 ICM17 cells each using a flat tip microinjection pipette with an internal diameter of 15-20  $\mu$ m fitted to a Piezo micromanipulator (Primetech, Ibaraki, Japan). Six embryos were transferred to each uterine horn of 4,5 dpc pseudopregnant SD/F344 recipient females previously mated to vasectomised males. Pregnancies were allowed to proceed either to midgestation (15 dpc) or to term as indicated in Table 3. Implantation sites were detected using alkaline solution according to methods described by Yamada et al. (Yamada et al., 1988)

### **3.3.4 DNA isolation and microsatellite analysis.**

DNA was isolated from carefully dissected midgestation (15 dpc) and term extraembryonic tissues and fetuses separately using the DNeasy DNA Extraction kit (Qiagen) and 100 nanograms of total DNA were used per PCR reaction in a final reaction volume of 50 ul per tube under the following conditions: 3 minutes at 94° followed by 35 cycles of 1 minute at 94°, 1 minute at 55° and 30 seconds at 72°, with a final elongation step of 5 minutes at 72°. The resulting PCR products were subjected to electrophoresis on agarose gels ranging between 3 and 4%, and visualised using ethidium bromide staining.

### **3.3.5 Statistical analysis.**

The data in tables 1 and 3 were analyzed with the chi-square exact test using the SAS program, version 9.1 (Cary, NC).

## **3.4 RESULTS**

### **3.4.1 Rat inner cell mass (ICM)-derived cell lines express markers typical of ES cells and are amenable to genetic modification.**

Four days after being placed in culture on a monolayer of mitotically inactivated mouse embryonic feeders (MEFs), rat blastocysts have attached and a prominent central mass of cells is apparent and distinct from the underlying trophoblast (Fig.1A). When standard mouse ES cell derivation protocols are performed on these blastocysts, a strain-dependent efficiency of cell line derivation is observed, as judged both by survival of ICM-derived cells past the seventh passage and positive alkaline phosphatase activity, a common marker



for undifferentiated cells (Table 1). There is a significant difference between strains with respect to the efficiency of derivation of cell lines from blastocysts (Table 1,  $p < 0.0001$ ). Indeed, as the contribution of the Fischer (F344) genetic background increases, so too does the efficiency of derivation. The contribution of BN strain rats in generating F1 hybrid cell lines is also important as it provides a coat colour marker. The typical morphology of these cell lines is depicted in figure 1B, where a large aggregate of rat ICM-derived cells is seen growing on top of cuboidal or cobblestone-shaped cells. The aggregate is composed of a central core of trypsin-resistant extracellular matrix and multiple layers of tightly packed cells having a high nucleus-to-cytoplasm ratio, the latter feature being characteristic of ES cells. This morphology was consistently observed upon passaging over a period of more than six and a half consecutive months of culture, indicating a capacity for long-term culture. In addition, this same morphology was maintained after thawing and culturing for another three months. The AP activity of the ICM-derived cell lines was assessed and scored as positive only in the case of intense staining, such as depicted in figure 1C. Another marker of undifferentiated cells, SSEA-1 (Fig. 1D), was also found to be uniformly positive on the AP-positive cell lines. Cell lines that were positive for AP at passage 7 (P7) were also positive at later passages, P20 and P23. SSEA-1 positive cell lines at P10 were also positive at P15 and P23. No obvious change was noted upon repeating the stainings at higher passage numbers. Analysis of the expression of *Oct4*, a POU domain transcription factor found in pluripotent cell populations, was also carried out at both low (P9) and high (P55) passage numbers (Fig. 2A and Table 2). *Oct4* mRNA was detected by RT-PCR in the mouse R1 ES cell line as well as in rat blastocysts, both of which are

positive controls chosen to test the suitability of our primers in assessing the presence of transcripts of both mouse and rat origin. Importantly, *Oct4* mRNA was also detected in our rat ICM17 ES-like cell line (Fig. 2A) at both low and high passage numbers, but not in negative controls, mouse embryonic fibroblasts (MEF) and without template (H<sub>2</sub>O). Karyotype analysis was also carried out on ICM17 cells and results indicated that a majority (65%) of twenty metaphase plates analyzed contained the normal diploid complement for the rat, i.e. 42 chromosomes (Fig. 2B). The combined results from morphological criteria, undifferentiated cell marker expression and RT-PCR analysis of *Oct4* in the ICM17 cell line prompted us to assess its capacity to undergo genetic modification, antibiotic selection and cryopreservation, since these characteristics are essential if ES-like cells are to be used in eventual gene-targeting experiments. A vector was designed and constructed to allow the expression of nuclear-localised EYFP under the control of the CAG promoter (pCMV/ $\beta$ actin/EYFP-Nuc) and to confer neomycin resistance to transfected cells. This vector was transfected into ICM17 cells and a 30 day G418 (neomycin analogue) selection was applied, after which time nuclear-localised EYFP transgene expression in transfected cells was confirmed by fluorescence microscopy (Fig. 2C, right panel). Under G418 selection, transfected cells continued to proliferate normally, while the untransfected cells under the same antibiotic selection conditions died within two weeks (data not shown). To validate the *Oct4* mRNA expression results obtained by RT-PCR on untransfected cells and to ensure that this important pluripotency marker was preserved following genetic manipulation *in vitro*, the ICM17 cell line was further characterised by immunostaining for *Oct4* protein using a monoclonal antibody (Fig. 2D

and Table 2). A strong nuclear-localised signal was observed in both untransfected and transfected ICM17 cells, despite the fact that both of these had been subjected not only to long-term culture (over 58 passages, corresponding to over six and a half consecutive months in culture), but also transfection, antibiotic selection and cryopreservation, then thawing and further culture prior to *Oct4* immunostaining. Further validation of *Oct4* expression was carried out by flow cytometric analysis and a significant *Oct4*-positive population was identified using the same monoclonal antibody. Indeed, when a mixed population of differentiated cuboidal cells and small aggregated round cells (both of the ICM17 cell line) were examined for expression of Oct4 protein by flow cytometry, no less than 11.5% of total cells were found to be positive, suggesting that in a fully undifferentiated population, that proportion would likely be much higher. Together, the data from RT-PCR, immunostaining and flow cytometry suggest not only that our culture system supports the growth of rat ES-like cells that retain *Oct4* mRNA and protein expression over long term-culture, but also that genetic modifications and associated *in vitro* manipulations do not adversely affect the expression of *Oct4*. Although from a BN x SD genetic background, the ICM17 cell line was not alone in its expression of pluripotent markers (Table 2). Indeed, cell lines of SD x SD and BN x F344 genetic backgrounds also showed positive AP activity, as well as SSEA-1 and *Oct4* mRNA expression or combinations thereof, suggesting that even though there is a strain-dependent efficiency of derivation, cell lines possessing numerous ES cell characteristics can be derived efficiently. In addition, the cell lines that survive for over seven passages while retaining AP activity

are similar to each other with respect to their *in vitro* morphology and in their expression of pluripotent markers, despite the differences in genetic background.

#### **3.4.2 Blastocyst injection of rat ES-like cells and embryo transfer.**

Incorporation of ES cells into blastocysts and subsequent contribution to tissues is considered the principal functional assay for verifying the developmental capacity and pluripotency of ES cell lines in the mouse. Therefore blastocyst injections and embryo transfers were carried out to investigate the contribution of the rat ES-like cell line ICM17 to embryos during development *in vivo*. Approximately 10 to 15 ICM17 cells were injected into each F344 x SD/F344 host blastocyst. The injected blastocysts were then cultured prior to embryo transfer, and full re-expansion of the blastocoelic cavity was observed in a majority (79%) of injected blastocysts within two to three hours, suggesting that the injected cells had integrated into the embryos (Fig. 3A). The injected blastocysts were then transferred to the uteri of pseudopregnant recipient females of SD/F344 background. A control (non-injected) embryo transfer experiment was carried out simultaneously to monitor the effectiveness of the technique. Of 15 control blastocysts transferred, 10 implantation sites (67%) were found and 7 live births were obtained by natural delivery, with all 7 pups surviving well into adulthood (Table 3). These results confirmed that the embryo transfer technique used was appropriate for assessing the developmental capacity of rat ES-like cells. No significant differences were found between the implantation rates of control and injected midgestation or injected term embryos (Table 3,  $p=0.96$ ). A total of 9 live births were obtained from experiments using injected blastocysts, and 6 of these pups

survived well into adulthood and are fertile, showing that the presence of ICM17 cells in host blastocysts did not hinder the normal development of the injected embryos that implanted and survived to term. An analysis of midgestation fetuses was also carried out to determine whether loss of fetuses derived from ES-like cell injection of blastocysts during pregnancy had occurred by this earlier developmental stage (15 dpc). A total of 7 midgestation fetuses of normal appearance were recovered, along with their placentae and associated extraembryonic membranes (Fig. 3B). A significant difference was found between the control and term gestation groups in total offspring number when compared to the number of implantation sites (Table 3,  $p=0.0006$ ), indicating postimplantation, preparturition mortality [i.e. 7 fetuses out of 10 implantation sites at midgestation (70%), compared to only 9 fetuses out of 62 implantation sites (15%) at term]. None of the surviving rats having developed from injected embryos showed any sign of coat colour chimerism (Fig. 3C), the albino coat colour originating from the host F344 x SD/F344 embryos.

#### **3.4.3 Rat ES-like cells can contribute to extraembryonic tissues in vivo.**

In order to ascertain the provenance of tissues resulting from the injected embryos, a microsatellite assay was adapted from a previously published report (Serikawa et al., 1992) to distinguish the different alleles corresponding to different strains of rat used (ICM17 cell line: BN x SD, recipient females: SD x F344, host blastocysts: F344 x SD/F344). Specifically, tissues originating from the ICM17 cell line can be clearly discerned from other strains of origin using this PCR-based assay by specific amplification of the tyrosine

aminotransferase (TAT) allele from BN rat strain DNA as previously shown, since the BN allele can only come from ICM17 cells in those samples. In other words, tissue samples where a BN specific band is amplified indicates that the ICM17 cell line has contributed at least in part to those tissues. Using this assay, it was determined that all extraembryonic tissues examined revealed the presence of BN, whereas recipient and non-injected controls did not (Fig. 4A-C). Note that no BN contribution to embryonic tissues was detected, neither from midgestation nor term samples (Fig. 4C and D).

### 3.5 DISCUSSION

Although the physiological characteristics and function of embryonic stem cells are poorly described (Joseph et al., 2005), their *in vitro* maintenance and characterisation, and more importantly, their use as an enabling technology in generating knockout mice, has become an unparalleled tool in mammalian genetics for deciphering gene function at an organismal level (Downing et al., 2004). Given the undeniable importance of the laboratory rat in biomedical research, it is not surprising that there have been several attempts worldwide at derivation of ES cells from this species (Mullins et al., 2004; Tesson et al., 2005). To date none of the published cell lines, including our own, have proven to be genuine ES cells, as defined by contribution to the three embryonic germ layers and the germline, hence they have been termed "rat ES-like cells" throughout this work. Comprehension of the biological causes underlying this recurrent failure in the rat remains to be elucidated.

Herein several lines of evidence suggest that the cell lines derived in this study are indeed rat ES-like cells. To begin, they are derived from the ICM of the blastocyst and, as such, they share a number of *in vitro* growth characteristics with mouse and human ES cells, including high nucleus-to-cytoplasm ratio and growth as tightly packed aggregates, both hallmarks of undifferentiated cells (Wobus et al., 2005). Besides satisfying the ES cell morphological criteria described above, the rat ES-like cell lines we describe express several markers of undifferentiated and pluripotent cells. They can be derived reproducibly and at reasonably efficient rates, although clearly this efficiency is strain-dependent. Most likely this strain-dependent efficiency is due to differences in genetic background. Perhaps the genetic and epigenetic regulation of a given genetic background is what confers the ability of some strains to maintain a more pluripotent and undifferentiated population of cells *in vitro*. Other attempts at rat ES cell derivation have also noted strain-dependent efficiency of derivation (Brenin et al., 1997; Fandrich et al., 2002; Buehr et al., 2003a). Our most extensively characterised cell line, ICM17, in addition to expressing pluripotency markers, displays a normal diploid complement of rat chromosomes and also expresses *Oct4* protein, as determined by immunofluorescence and flow cytometry, even after transfection, selection, cryopreservation and thawing. This is the first published report of *Oct4* protein expression in rat ES-like cells, both untransfected and transfected, and as such is in sharp contrast to previous reports of a lack of *Oct4* expression in similar cell lines. Incidentally, this is also the first published report of successful genetic modification and transgene expression in rat ES-like cells. A previous report indicated that their *Oct4*-negative cells were transfectable, however no data supporting this was shown (Buehr et al.,

2003a). Our results are significant since they demonstrate that although long-term culture and extensive *in vitro* manipulations quite similar to those used in gene-targeting experiments were carried out using our ES-like cells in order to introduce an exogenous DNA construct and select positive cells with G418, these manipulations did not adversely affect either the morphology, *in vitro* growth characteristics, nor the expression of a key marker of pluripotency. Most importantly, and to our knowledge for the first time, our rat ES-like cells of the ICM17 cell line were able to contribute *in vivo* to functional extraembryonic tissues during development.

Morphologically similar cell lines have been reported both in the rat and the mouse, for example in the rat at least two reports describe the growth of their cells as tightly packed aggregates and also note their sensitivity to trypsin (Vassilieva et al., 2000; Ruhnke et al., 2003). In the case of the mouse, Kunath et al. (Kunath et al., 2005) describe the derivation of a novel type of extraembryonic stem cell (termed XEN cell lines) which displays interchangeable epithelioid and endodermal cell types. While XEN and rat ICM-derived cells (Vassilieva et al., 2000; Ruhnke et al., 2003) are morphologically similar to cells in our cultures, crucial differences exist in both when compared to our cell lines. Microarray gene expression analysis showed that pluripotent ES cell markers (including *Oct4*) were notably absent from mouse XEN cell lines (Kunath et al., 2005). In the case of other rat blastocyst-derived cell lines, either inability to culture the cells *in vitro* over sufficient periods of time (Ouhibi et al., 1995), variability in pluripotent marker expression (Notarianni et al., 2001; Fandrich et al., 2002; Ruhnke et al., 2003; Buehr et al., 2003a) or lack of complete *in vivo* characterisation (Vassilieva et al., 2000; Buehr et al., 2003a) and in



some cases combinations of these factors have rendered their ES identity inconclusive. Iannaccone et al. (Iannaccone et al., 1994) claimed to have derived pluripotent cells from the rat that were capable of contributing to chimeras, however microsatellite analysis later revealed that their cultures were in fact contaminated with mouse ES cells (Brenin et al., 1997). Other reports of rat ES-like cell lines focused exclusively on an *in vitro* characterisation, leaving the issue of the developmental capacity and pluripotency of their cell lines open to debate (Ouhibi et al., 1995; Vassilieva et al., 2000; Notarianni et al., 2001). Vassilieva et al. (Vassilieva et al., 2000) noted that their cells were AP, SSEA-1 and *Oct4* positive as determined by RT-PCR, however no mention was made of *Oct4* protein nor of *in vivo* developmental capacity or contribution to an embryo, fetus or postnatal rat, nor to any extraembryonic tissues. The only two reports where morphologically similar cells were tested *in vivo* by injection either into 8-cell rat embryos or intraportally into adult rats, the cell lines used were described by the authors as *Oct4*-negative, which implies that they may represent cells more differentiated than those described here (Fandrich et al., 2002; Buehr et al., 2003a).

The reasons for the exclusion of our cells from contribution to embryonic germ layers at present are unclear, given the pluripotent marker expression of the ICM17 cell line as determined from the *in vitro* characterisation and the fact that following their injection into host blastocysts full re-expansion of the blastocoelic cavity had occurred. It is clear from the results that many embryos injected with the ICM17 cells experienced postimplantation, preparturition mortality. It may be that in these embryos, the injected rat ES-like cells integrated the ICM, but were unable to undergo the normal developmental

program of embryogenesis. Therefore, these embryos, perhaps due to abnormalities in gene expression brought on by prolonged *in vitro* culture of the injected ICM17 cells, were not able to proceed normally through embryogenesis. In such a case, only the embryos in which the ICM17 cells were capable of complying to the normal developmental program survived. The injected cells, relegated to the primitive endoderm and/or trophoblast lineages, contributed to a functional placenta capable of supporting development of the embryo. A possible biological explanation for exclusion from embryonic contribution may be that rat and mouse epiblasts exhibit a difference in their pluripotent characteristics and developmental potential *in vivo*, a fact that has been observed in several reports (Sobis et al., 1993; Nichols et al., 1998; Knezevic et al., 2005), and that this difference is carried over during *in vitro* propagation and reintroduction into embryos. Perhaps the *in vitro* counterparts of rat epiblasts (such as the ES-like cell line ICM17) represent cell populations that are intermediate in phenotype between pluripotent epiblast and slightly more differentiated primitive endoderm. This could explain our observation of abundant extracellular matrix material secretion by the cell lines in culture (characteristic of parietal endoderm) along with simultaneous pluripotent marker expression characteristic of epiblast. However, it appears unlikely that the absence of *Oct4* alone accounts for the lack of contribution of ES-like cells to fetal tissues, as has been hypothesized either for the rat (Buehr et al., 2003a) or for non-permissive mouse strains (Buehr et al., 2003b). Rather, from the results presented here, it appears as though rat ES-like cells can, under certain conditions, maintain expression of *Oct4* over long-term culture, even though this alone does not appear to be sufficient for embryonic contribution. This may not be surprising after all

in light of other publications that point to the existence of complex combinatorial regulatory networks in human ES cell cultures, networks in which *Oct4* certainly plays a vital role, however most likely in cooperation with other factors such as *Nanog* and *Sox2* (Boiani et al., 2005; Boyer et al., 2005). It is also conceivable that an optimization of embryo injection or aggregation techniques at different developmental stages may help in deciphering the full potential of rat ES-like cells such as the ICM17 line (Lallemand et al., 1990; Kunath et al., 2005).

In summary, for the first time, we have shown that rat ES-like cells expressing a panel of pluripotent cell markers are able to contribute to developing extraembryonic tissues *in vivo*. These results are significant since they confirm that although at present, rat ES-like cells appear incapable of contributing to the fetal germ layers and germline of chimeras, they still possess the noteworthy capacity to contribute to developing extraembryonic tissues under physiological conditions. The cell lines described here may therefore represent a valuable tool to study early developmental events involved in cell lineage decisions between pluripotent epiblast and primitive endoderm in the early rat embryo.

### 3.6 ACKNOWLEDGMENTS

We thank Carmen Léveillé and Joëlle Desmarais for technical assistance and helpful discussions, Richard Bourassa for assistance with figures, and Guy Beauchamp for statistical analyses. We also thank Dr Andras Nagy, Reka Nagy, Dr Janet Rossant and Dr

Wanda Abramow-Newerly for the R1 mouse ES cell line. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, (Industrial Postgraduate Scholarship to S.-P.D.) and by Clonagen inc..

### 3.7 REFERENCES

- Baqir, S. and Smith, L.C. (2003). Growth restricted in vitro culture conditions alter the imprinted gene expression patterns of mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 5, 199-212.
- Boiani, M. and Scholer, H.R. (2005). Developmental cell biology: Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 872-881.
- 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. and Young, R.A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956.
- Brenin, D., Look, J., Bader, M., Hubner, N., Levan, G. and Iannaccone, P. (1997). Rat embryonic stem cells: a progress report. *Transplant Proc* 29, 1761-1765.
- Buehr, M., Nichols, J., Stenhouse, F., Mountford, P., Greenhalgh, C.J., Kantachuvesiri, S., Brooker, G., Mullins, J. and Smith, A.G. (2003a). Rapid loss of Oct-4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines. *Biol Reprod* 68, 222-229.

- Buehr, M. and Smith, A. (2003b). Genesis of embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 1397-1402; discussion 1402.
- Downing, G.J. and Battey, J.F., Jr. (2004). Technical assessment of the first 20 years of research using mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 22, 1168-1180.
- Eggan, K., Akutsu, H., Loring, J., Jackson-Grusby, L., Klemm, M., Rideout, W.M., 3rd, Yanagimachi, R. and Jaenisch, R. (2001). Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6209-6214.
- Fandrich, F., Lin, X., Chai, G.X., Schulze, M., Ganten, D., Bader, M., Holle, J., Huang, D.S., Parwaresch, R., Zavazava, N. and Binas, B. (2002). Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med* 8, 171-178.
- Gill, T.J., 3rd, Smith, G.J., Wissler, R.W. and Kunz, H.W. (1989). The rat as an experimental animal. *Science* 245, 269-276.
- Hogan, B. (1994). *Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.) xvii, 497 p.
- Iannaccone, P.M., Taborn, G.U., Garton, R.L., Caplice, M.D. and Brenin, D.R. (1994). Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev Biol* 163, 288-292.
- Jacob, H.J. (1999). Functional genomics and rat models. *Genome Res* 9, 1013-1016.
- Joseph, N.M. and Morrison, S.J. (2005). Toward an understanding of the physiological function of Mammalian stem cells. *Dev Cell* 9, 173-183.

- Keefer, C.L., Pant, D., Blomberg, L. and Talbot, N.C. (2007). Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Anim Reprod Sci* 98, 147-168.
- Knezevic, V., Poljak, M., Bradamante, Z., Serman, D., Levak-Svajger, B. and Svajger, A. (2005). Yolk sac carcinoma derived from the rat epiblast as a renal isograft. *Coll Antropol* 29, 189-197.
- Kunath, T., Arnaud, D., Uy, G.D., Okamoto, I., Chureau, C., Yamanaka, Y., Heard, E., Gardner, R.L., Avner, P. and Rossant, J. (2005). Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development* 132, 1649-1661.
- Lallemand, Y. and Brulet, P. (1990). An in situ assessment of the routes and extents of colonisation of the mouse embryo by embryonic stem cells and their descendants. *Development* 110, 1241-1248.
- Mullins, L.J., Wilmut, I. and Mullins, J.J. (2004). Nuclear transfer in rodents. *J Physiol* 554, 4-12.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. and 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, 8424-8428.
- Nichols, J., Smith, A. and Buehr, M. (1998). Rat and mouse epiblasts differ in their capacity to generate extraembryonic endoderm. *Reprod Fertil Dev* 10, 517-525.
- Notarianni, E. and Flechon, J. (2001). Parietal endoderm cell line from a rat blastocyst. *Placenta* 22, 111-123.

- Ouhibi, N., Sullivan, N.F., English, J., Colledge, W.H., Evans, M.J. and Clarke, N.J. (1995). Initial culture behaviour of rat blastocysts on selected feeder cell lines. *Mol Reprod Dev* 40, 311-324.
- Ruhnke, M., Ungefroren, H., Zehle, G., Bader, M., Kremer, B. and Fandrich, F. (2003). Long-term culture and differentiation of rat embryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages. *Stem Cells* 21, 428-436.
- Serikawa, T., Kuramoto, T., Hilbert, P., Mori, M., Yamada, J., Dubay, C.J., Lindpainter, K., Ganten, D., Guenet, J.L., Lathrop, G.M. and et al. (1992). Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics* 131, 701-721.
- Sobis, H., Verstuyf, A. and Vandeputte, M. (1993). Visceral yolk sac-derived tumors. *Int J Dev Biol* 37, 155-168.
- Tesson, L., Cozzi, J., Menoret, S., Remy, S., Usal, C., Fraichard, A. and Anegon, I. (2005). Transgenic modifications of the rat genome. *Transgenic Res* 14, 531-546.
- Vassilieva, S., Guan, K., Pich, U. and Wobus, A.M. (2000). Establishment of SSEA-1- and Oct-4-expressing rat embryonic stem-like cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth. *Exp Cell Res* 258, 361-373.
- Wobus, A.M. and Boheler, K.R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85, 635-678.
- Yamada, T., Ohsawa, K. and Ohno, H. (1988). The usefulness of alkaline solutions for clearing the uterus and staining implantation sites in rats. *Jikken Dobutsu* 37, 325-331.

**3.8 FIGURES AND TABLES****TABLE 3.1** Strain-dependent efficiency of rat ES-like cell line derivation

Strain	Blastocysts (n)	Cell lines (%)*	AP-positive lines
SD x SD	14	1 (7)	1
BN x SD	20	2 (10)	2
BN x SD/F344	10	4 (40)	2
BN x F344	10	8 (80)	6

\*Surviving past 7<sup>th</sup> passage,  $p < 0.0001$



**TABLE 3.2** Characterisation of rat ES-like cell lines

Cell line	Strain	AP	SSEA-1	<i>Oct4</i> mRNA	<i>Oct4</i> protein	Passage number*
BI 6	<i>SD x SD</i>	Y	-	Y	-	18
D12	BN x SD	Y	Y	-	-	18
ICM17	BN x SD	Y	Y	Y	Y	58
R18.04	BN x F344	Y	Y	-	-	19

Y: Yes/positive signal, -: Not investigated

\*Highest reached before cryopreservation

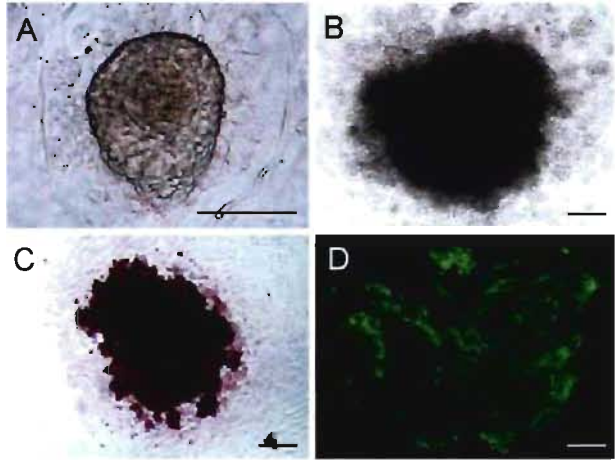
TABLE 3.3 Extraembryonic contribution of rat ES-like cell line ICM17

Group	Embryos transferred	Embryos implanted (% transf.)*	Total offspring (% impl.) **	Embryonic contribution	Extra-embryonic contribution
Control	15	10 (67)	7 (70)	n/a	n/a
Term	93	62 (67)	9 (15)	0/2	4/4
Midgestation	24	15 (63)	n/a	0/7	7/7

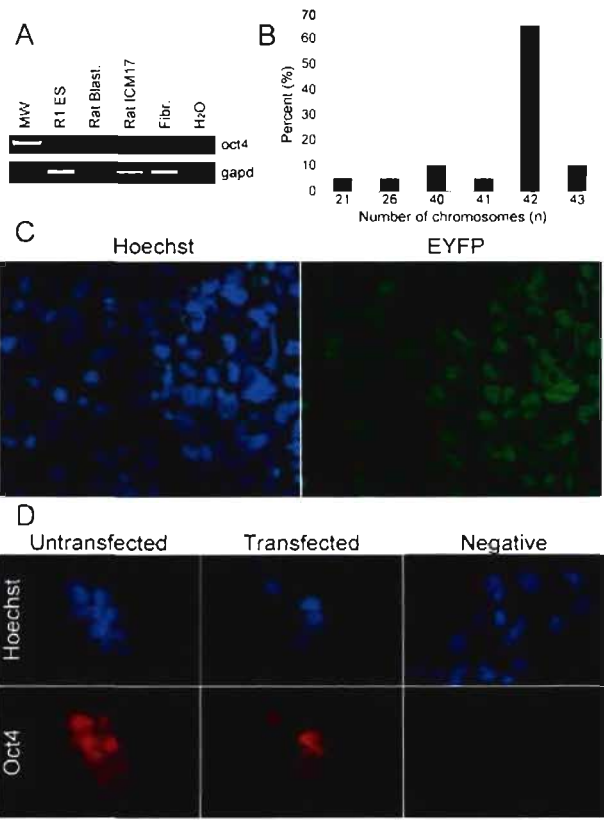
n/a: Not applicable

\*: p=0.96

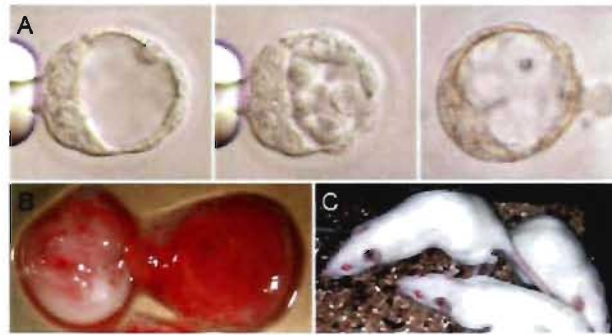
\*\* : p=0.0006



**FIG 3.1** Rat ICM-derived cell lines exhibit morphological and molecular markers of undifferentiated cells. **(A)** Attached rat blastocyst after 4 days of culture. Note the ICM clearly rising above the underlying sheet of trophoblast cells. **(B)** Typical morphology of cell lines. Note the large dense central core and tightly packed aggregates of cells. **(C)** Alkaline phosphatase (AP) staining of the ICM17 cell line showing positive activity throughout but especially in cells at the periphery. **(D)** SSEA-1 immunostaining of ICM17 cell line. A strong uniform positive signal can be seen at the cell surface. (Scale bar, 200  $\mu\text{m}$  in A-C and 60  $\mu\text{m}$  in D.)

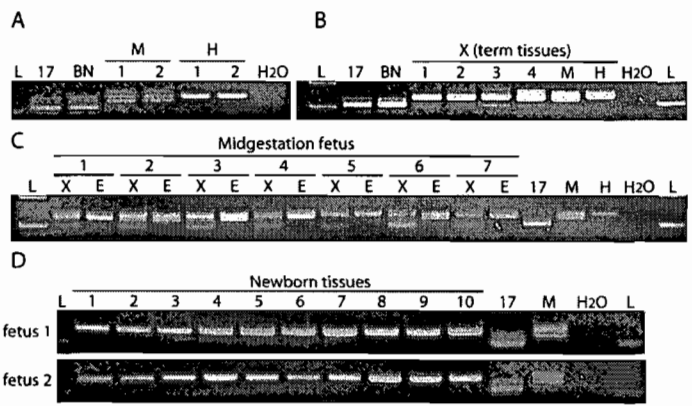


**FIG 3.2** *Oct4* expression, normal diploid karyotype and EYFP transgene expression of ICM17 rat ES-like cell line. **(A)** RT-PCR analysis of embryonic tissues. *Oct4* mRNA was detected in R1 mouse ES cells (R1-ES), rat blastocysts (Rat Blast.), and rat ES-like cells (Rat ICM17), but not in the negative controls, mouse embryonic fibroblasts (Fibr.) and no template (H<sub>2</sub>O). *Gapd* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) served as an internal control. **(B)** Karyotyping of ICM17 cell line. Distribution of chromosome number showing a sharp mode at 42 chromosomes, the normal diploid complement for the rat. **(C)** EYFP transgene expression in ICM17 cell line. As expected from the vector used, EYFP transgene expression is localised to the nucleus in transfected cells viewed under blue light illumination. Hoechst nuclear staining is included as a control (magnification, 400X). **(D)** *Oct4* immunostaining of untransfected and transfected ICM17 cell line. A strong positive signal is localised to the nucleus in both cases, whereas no signal is detected when the *Oct4* antibody is omitted (magnification, 400X).



**FIG 3.3** *In vivo* pluripotency assay for rat ES-like cells. (A) Blastocyst injection and re-expansion of the blastocoelic cavity three hours later. Note that most of the injected rat ES-like ICM17 cells have integrated into the embryo (right panel). (B) Rat midgestation fetus along with all its associated extraembryonic membranes. (C) Rats born following embryo transfer of injected blastocysts to a pseudopregnant female. The coat colour seen here (albino) appears to represent exclusively that derived from host blastocysts.





**FIG 3.4** *In vivo* contribution of rat ES-like cells to extraembryonic tissues. Microsatellite analysis of midgestation and term tissues using tyrosine aminotransferase (TAT) alleles. **(A)** Controls used in the experiments (L: Molecular weight ladder, 17: ICM17 DNA, BN: Brown Norway strain DNA, M: DNA from two different recipient mothers, H: DNA from two different non-injected hosts). **(B)** ICM17 contribution to the extraembryonic tissues of four different term pups (X: Extraembryonic tissues 1-4). **(C)** ICM17 contribution to the extraembryonic tissues of seven different midgestation fetuses (X: Extraembryonic tissues, E: Embryonic tissues). **(D)** Lack of detectable ICM17 contribution in ten tissues (1-10) taken from two different neonates. Note that the lower bands in (A-D) indicate contribution of BN (from the injected ICM17 cell line) to developing tissues in all extraembryonic tissues examined.

## 4.0 ARTICLE DEUXIÈME

### **Running Head: Heterogeneity of Rat Embryonic Stem-Like Cells**

**Title:** Evaluation of Developmental Capacity Reveals Heterogeneity of Rat Embryonic Stem-Like Cells

**Authors:** Simon-Pierre Demers, Joëlle A. Desmarais, Patrick Vincent, Lawrence C. Smith

**Institutions:** Centre de recherche en reproduction animale (CRRA), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada.

#### **Author Contributions:**


Simon-Pierre Demers : Conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing

Joëlle A. Desmarais : Collection and assembly of data, data analysis and interpretation

Patrick Vincent : Collection and assembly of data

Lawrence C. Smith : Conception and design, financial support, data analysis and interpretation, final approval of manuscript

#### **Corresponding Author:**

Lawrence C. Smith, DVM, MSc, PhD, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6. Phone : 

**Research Support:** Support for this work was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (Industrial Postgraduate Scholarship to S.-P. Demers), by Clonagen inc., and by the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

**Key words:** Embryonic Stem Cells, Cell Lineage, Heterogeneity, Embryonic Development, Rats

#### 4.1 ABSTRACT

Despite recent advances in the derivation of rat embryonic stem (ES) cells, gene-targeting technology is still not available in this species of vital importance to biomedical research. Full comprehension of mechanisms underlying the absence or infrequency of contribution of rat ES cells to tissues of the embryo and the germline is lacking. We have previously shown the *in vivo* contribution of rat ES-like (RESL) cells to developing tissues. To elucidate possible mechanisms governing the behavior of RESL cells, we evaluated their developmental capacity using several approaches. First, marker analysis demonstrated the robust expression profile of genes characterizing pluripotency of RESL cells. *In vitro* differentiation through embryoid body formation showed *in vitro* pluripotent capacity through differentiation into derivatives of all three embryonic germ layers. Blastocyst injection, and diploid (2n) and tetraploid (4n) aggregation, coupled with *in vivo* cell fate analysis, demonstrated *in vivo* multipotency through RESL cell contribution to multiple developmentally distinct extraembryonic lineages. We hypothesized that RESL cells constitute heterogeneous populations, composed of multiple subsets of cells displaying varying capacities for differentiation. Hallmark features of heterogeneity were revealed following quantitative analysis of pluripotent marker expression in undifferentiated and differentiated RESL cells by flow cytometry. Together, these results provide new insight into exclusion of RESL cells from contributing to embryonic tissues *in vivo* via

demonstration of the presence of heterogeneity within undifferentiated RESL populations, and will accelerate discovery of conditions allowing efficient embryonic and germline contribution of rat ES cells, a prerequisite to the generation of knockout rats.

## 4.2 INTRODUCTION

The development and application of gene-targeting technology using embryonic stem (ES) cells in the rat is long-awaited, not only because the larger size of this species simplifies manipulation and repeated sampling, but because the rat is the model of choice for an important number of biomedical research fields [1-3]. Due to the extensive information currently available on rat and its physiology [4, 5], the analysis of specific knockout rat phenotypes relevant to human disease will expand our understanding of the human condition and allow development of treatments to improve health and quality of life. Before this can be achieved, it is essential to conclusively demonstrate germline transmission of gene-targeted rat ES cells, a feat not yet reported. In turn, accomplishment of efficient rat ES cell contribution to embryonic tissues and the germline requires improved knowledge of the nature of the starting population of rat ES cells and of the conditions required to maintain large numbers of such cells in the undifferentiated and pluripotent state.

Some recent progress has been made through demonstration of germline transmission of rat ES cells maintained under specialized culture conditions requiring chemical inhibitors [6, 7]. However, in these studies, the culture conditions were not optimized to allow efficient germline transmission. Further, it is not known whether gene-targeting procedures, which require long-term culture and drug selection regimes, will maintain rat ES cells in a sufficiently pluripotent state to allow germline transmission of gene-targeted rat ES cells. Cell lines derived from rat blastocysts under conventional ES

cell culture conditions, including culture with leukemia inhibitory factor (LIF), fetal bovine serum (FBS) and mouse embryonic fibroblasts (MEFs), either lose expression of the pluripotency marker, Oct4 (also known as Pou5f1), within a few days [6, 8], or do not have the capacity to contribute to the germline [9]. Rat embryonic stem-like (RESL) cells recently developed in our laboratory maintain high levels of Oct4 expression over long-term culture, and, as recently demonstrated for the first time, can contribute to developing extraembryonic tissues *in vivo* [10].

In previous reports we suggested that RESL cells are intermediate in phenotype between pluripotent epiblast and primitive endoderm [10, 11]. Evidence for heterogeneity of ES cells in both the mouse and human has accumulated recently [12-17] and suggests that different subsets of cells within undifferentiated ES cell populations display a bias in differentiation potential. The purpose of current investigations was to test the hypothesis that RESL cell populations are phenotypically heterogeneous, containing multiple subsets with varying differentiation capacities.

The developmental capacity of RESL cells was rigorously evaluated using a variety of approaches, combining multiple embryo injection and aggregation techniques with *in vivo* cell fate analysis, *in vitro* differentiation and marker expression analysis. We extend existing knowledge by demonstrating that RESL cells maintain expression of multiple pluripotency markers under conventional ES culture conditions without the use of chemical inhibitors, and are able to differentiate *in vitro* as embryoid bodies into derivatives of all three primary embryonic germ layers, all the while displaying robust *in vivo* multipotency.

Most importantly, we provide evidence that RESL cells are heterogeneous populations and provide important clues as to culture requirements of RESL cells.

### **4.3 MATERIALS AND METHODS**

#### **4.3.1 Cell Culture**

The culture medium, Rat ES medium, as well as the derivation, culture and characterization of RESL cells have been described previously [10, 11]. For in vitro differentiation, aggregates of RESL cells were triturated gently and resuspended in Rat ES medium in the absence of LIF and of MEFs and plated in non-adherent bacteriological dishes at a density of  $1.3 \times 10^4$  cells/mL. The medium was changed after 4 days of culture, and following further culture in non-adherent conditions for another 3 days, embryoid body-derived RESL cells (EB cells) were transferred to 35 mm dishes for attachment (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA). EB cells were then passaged with trypsin, plated at a density of  $3.0 \times 10^4$  cells/mL, and expanded for further culture and analysis.

#### **4.3.2 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction and Genomic DNA Analysis**

Total RNA was isolated using a RNeasy Micro kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Reverse transcription was carried out using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) after DNase treatments to eliminate genomic DNA contamination. As an additional precaution and whenever possible, primers were designed to span different exons. The following primers and annealing temperatures in degrees



Celsius (Ta) were used: *Oct4* : forward 5'-CGAGGAGTCCCAGGACATGAAA-3';  
 reverse 5'-TGGGGGCAGAGGAAAGGATACA-3'; Ta = 57; *Nanog* : forward 5'-  
 TGCCTGCCGTTTCATCTTCCTG-3'; reverse 5'-AGGTCTGACTGCCCCATACTG-3';  
 Ta = 57; *Sox2* : forward 5'-GGCGGCAACCAGAAGAACAG-3'; reverse 5'-  
 AGAAGAGGTAACCACGGGGG-3'; Ta = 57; *Rex1* : forward 5'-  
 CGATGCTGGAGTGTCTCAA-3'; reverse 5'-CTCGCAGCCATCAAAAGGAC-3'; Ta  
 = 58; *Tdgfl* : forward 5'-TCCTTTTGTGCCTGCCCTCC-3'; reverse 5'-  
 KGGAACACTTCYTGGGCTGC-3'; Ta = 58; *Gdf3* : forward 5'-  
 GACCTGGGTTGGCACAAGTG-3'; reverse 5'-ATKGGMGASAGCTTGGTGGG-3'; Ta  
 = 58; *Gapdh* : forward 5'-GTCCATGCCATCACTGCCAC-3'; reverse 5'-  
 CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'; Ta = 55; *Foxa2* : forward 5'-  
 CCTGAGTCCGAGTCTGAGCC-3'; reverse 5'-CGAGATGTACGAGTAGGGAGG-3';  
 Ta = 55; *Sparc* : forward 5'-CGAGGAGGTGGTGGCTGAAA-3'; reverse 5'-  
 GTTGTGGCCCTCATCTCTCTC-3'; Ta = 60; *Gata4* : forward 5'-  
 GCAGCAGCAGCAGTGAAGAGA-3'; reverse 5'-ATGTCCCCATGACTGTCAGCC-3';  
 Ta = 55; *Runx2* : forward 5'-ACAGCCTCTTCAGCACAGTG-3'; reverse 5'-  
 AACTCTTGCCTCGTCCACTC-3'; Ta = 57; *Nodal* : forward 5'-  
 GCAGACATCATCCGCAGCCT-3'; reverse 5'-GTAGATGATCCAGGAGCCCC-3'; Ta  
 = 57; *Gata6* : forward 5'-AACGGGACGTACCACCACCA-3'; reverse 5'-  
 GCACAGGACAATCCAAGCCG-3'; Ta = 57; *Eomes* : forward 5'-  
 CCACCGCCACCAAAGTGGAGATG-3'; reverse 5'-  
 CAGTATTAGGAGACTCTGGGTGAA-3'; Ta = 57. Genomic DNA was isolated and

analyzed as described [10], with the exception that PCR products were subjected to electrophoresis on agarose gels ranging between 1 % and 2 %.

### **4.3.3 Immunofluorescence and Flow Cytometry**

RESL and EB cells were grown on Lab-Tek II CC2 chamber slides (Nalge Nunc International) and fixed with methanol at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 5 min, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), washed twice with 0.05 % Tween/PBS (TPBS) for 5 min at room temperature (RT), permeabilized with 0.1 % Triton X-100/PBS for 10 min at RT, washed twice with TPBS for 5 min at RT, blocked with 4 % normal goat serum/PBS for 60 min at RT, and incubated with primary antibody diluted in 4 % NGS/PBS overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Then cells were washed three times with TPBS for 10 min at RT, incubated with secondary antibody diluted in 4 % NGS/PBS for 90 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , washed three times with TPBS for 10 min at RT, and mounted with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Slow-Fade Gold mounting medium (Invitrogen) and a coverslip prior to image acquisition. For negative controls, cells were incubated with corresponding isotype antibodies instead of primary antibodies. Images were acquired using an Olympus FV1000 laser-scanning confocal microscope (Olympus Canada, Markham, ON, Canada). Image acquisition and export as TIFF files was conducted using Olympus Fluoview software FV10-ASW. Antibody sources and dilutions: Oct4 (1/50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Nestin (1/100, Chemicon International, Temecula, CA, USA), Sox1 (1/100, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), Tubb3 (also known as BetaIII-tubulin) (1/25, Chemicon), Sox17 (1/25, Santa Cruz), Brachyury (1/25, Santa Cruz). Alexa-fluor (Santa Cruz) secondary

antibodies were used at a dilution of 1/1000. For fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis, the above protocol was used, with the exception that RESL and EB cells were grown on tissue culture-treated dishes, fixed with methanol at  $-20^{\circ}\text{C}$  overnight, centrifugation carried out at  $1000 \times g$ , and secondary antibody incubated for 45 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Antibody sources and dilutions: Nestin (1/50), Sox1 (1/50), Sox17 (1/50), Brachyury (1/50), Nanog (1/50, Chemicon), Sox2 (1/50, Chemicon), Oct4 (1/50). FACS analysis was carried out with a FACSVantage SE (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). Gates were set relative to isotype controls. Collected data were analyzed using Cellquest Pro software (Becton Dickinson).

#### **4.3.4 Animals, Embryos and Procedures**

All procedures using animals were conducted according to protocols approved by the institutional animal care and use committee in accordance with Canadian Council on Animal Care regulations. Rats of Sprague-Dawley (SD), Fischer (F344) and Brown Norway (BN) strains were purchased from Charles River Canada (St-Constant, QC, Canada). Wistar-TgNCAG-GFP184Ys rats (RRRC line 259 Wistar, Rat Resource & Research Center, Columbia, MO, USA) were used for diploid (2n) and tetraploid (4n) aggregation experiments. Host embryos were obtained by mating SD/F344 females with F344 males. The presence of spermatozoa in vaginal smears at noon the day following copulation was taken as embryonic day (E) 0.5 of gestation. Blastocyst injections and embryo transfers were carried out as described [10]. Embryo aggregation procedures were adapted from the mouse and from earlier studies on rat embryos [18, 19] with the exception

that the culture medium for embryo culture and aggregation was mR1ECM [20]. 4n embryos were generated as described [18].

#### **4.3.5. Immunohistochemistry**

Immunohistochemistry was conducted according to the protocol described by Desmarais and colleagues [21], with the following modifications: A primary rabbit polyclonal antibody recognizing GFP and its variants was used at 1:10 dilution (Clontech, Palo Alto, CA, USA). A biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody (1 $\mu$ g/ml; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used to detect GFP and EYFP proteins. No signal was obtained when both primary and secondary antibodies were tested together on wild type tissues. Negative control sections were submitted to the same procedures, except that the first antibody was replaced with 10 % NGS/TPBS.

#### **4.3.6. Statistical analysis**

The chi-square exact test was used to analyze the data in Table 1, using the SAS program (Cary, NC, USA).

## 4.4 RESULTS

### 4.4.1 RESL Cells Express Multiple Pluripotency Markers

We previously reported the isolation and both in vitro and in vivo characterization of novel RESL cells that maintain Oct4 mRNA and protein expression after multiple in vitro manipulations and long-term culture [10]. These cells possess a normal 2n karyotype and are also positive for alkaline phosphatase and stage-specific embryonic antigen-1 [10]. In an attempt to expand on these results and interrogate the pluripotent marker status of these cells, RT-PCR was used to assess the presence of transcripts known to be expressed in both mouse and human ES cells. Transcripts coding for numerous pluripotency markers including *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Rex1* (also known as *Zfp42*), *Tdgf1*, and *Gdf3* were found to be expressed in undifferentiated RESL cells (Fig. 1A). Positive control cDNA from rat blastocysts was used to ensure suitability of the primers for amplifying rat transcripts. Using immunofluorescence, expression of Oct4 protein was found to localize to the nucleus as expected, while no signal was detected using the isotype control (Fig. 1B). Together, these results confirmed the ES-like identity of our cells with respect to pluripotent marker expression.

### 4.4.2 Cell Fate Analysis Reveals In Vivo Multipotency of RESL Cells Following Blastocyst Injection and Embryo Transfer

In vivo assessment of developmental capacity is essential to determine the functionality of ES cells. In our previous studies, we demonstrated that RESL contribute in vivo to

developing extraembryonic tissues after blastocyst injection and embryo transfer [10]. To determine whether RESL cells were able to contribute to multiple tissues and the germline of rats *in vivo*, this method of blastocyst injection followed by embryo transfer was performed, rather than teratoma formation. An enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) transgene was used as an intracellular marker to track the cell fate and developmental potential of RESL cells *in vivo*, to better determine their exact tissue distribution. The majority (over 58.6 %) of transfected cells were shown to express the transgene (Fig. 2A). A total of 51 2n rat blastocysts were injected with transgenic cells and transferred to the uteri of pseudopregnant recipients. The injected cells were seen to fluoresce brightly after blastocyst injection (Fig. 2B), indicating the suitability of the transgene for tracking cell fate *in vivo*. At E17.5, uteri were recovered and implantation sites and fetuses were counted and analyzed. A total of 31 implantation sites were found (61 % of transferred embryos), and 11 fetuses were recovered (37 % of implanted embryos), indicating successful embryo transfer procedures. A PCR assay on genomic DNA isolated separately from embryonic and extraembryonic tissues of recovered fetuses was used to detect the presence of the transgene in these tissues (Fig. 2C). Using this assay, the extraembryonic tissues of six fetuses were found to contain the transgene, indicating that the ES-like cells had contributed to these tissues during development, validating the results of our previous study [10]. Next, to determine the cell fate of the injected transgenic RESL cells *in vivo*, their precise tissue distribution was tracked using immunohistochemistry. Duplicate samples of extraembryonic tissues found to be positive for the EYFP transgene by PCR were subjected to immunohistochemistry for detection of EYFP protein in tissue sections. As can be seen

in Fig. 2D, EYFP-positive cells were found in multiple developmentally distinct extraembryonic lineages, notably in trophoblast, visceral yolk sac, and parietal yolk sac tissues, clearly demonstrating that these cells are multipotent and can contribute to functional and developmentally distinct extraembryonic tissues during development. Despite this wide developmental potential, however, their *in vivo* contribution was still restricted to extraembryonic tissues, and not found in embryonic tissues.

#### **4.4.3 Embryo Aggregation and Transfer Assays Also Reveal *In Vivo* Multipotency of RESL Cells**

We surmised that the host blastocyst stage embryo restricts the developmental potential of RESL cells by hampering their physical integration into the inner cell mass (ICM). Our hypothesis was that RESL cells could contribute to a wider range of tissues if host embryos at an earlier developmental stage than the blastocyst were used to carry out the *in vivo* developmental capacity assays. To test this hypothesis, we adapted an embryo aggregation assay frequently used in mice to determine the developmental potential of ES cells and to generate embryonic chimeras [22]. 2n eight-cell stage rat embryos were collected and used to generate aggregates with transgenic RESL cells as shown in Figure 3A. 4n embryos were successfully generated by electrofusion of two-cell stage embryos (Fig. 3B, left panel) at a highly efficient rate of 97 % (137/141). Confirmation of complete fusion was carried out by visual observation of blastomere membrane unification 30 minutes later (Fig. 3B, right panel), and all unfused two-cell stage embryos were set aside from fused embryos at this time. After 48 hours of *in vitro* culture to the four-cell stage, pairs of 4n embryos were then

used to generate aggregates with RESL cells by co-culture as for 2n aggregates (Figure 3A). To exclude the possibility that RESL cells are simply unable to integrate into the ICM, their cell fate in chimeric blastocysts following aggregation was observed by fluorescence microscopy. Thus, after 36 hours of in vitro culture, the resulting blastocysts were examined to determine the contribution of fluorescent RESL cells to various compartments. Transgene-expressing cells were found throughout resulting blastocysts, illustrating their capacity to contribute to both the ICM and the trophectoderm compartments in chimeric blastocysts (Fig. 3C).

The in vitro culture system proved to be very efficient, since most of the control 2n embryos successfully reached the morula/blastocyst stage (Table 1). In addition, no significant difference was found in terms of in vitro development rate between the control, 2n aggregation, and 4n aggregation groups ( $p=0.30$ ). Embryos from all three groups were transferred to the uteri of pseudopregnant dams to assess their developmental capacity. At E14, uteri were recovered and implantation sites and fetuses were counted. No significant difference was found in the implantation rate, nor in the in vivo development rate of fetuses to midgestation (Table 1;  $p=1$  and  $p=0.17$  respectively). The results from both in vitro and in vivo development suggest that the presence of RESL cells in aggregates did not adversely affect either implantation rate or in vivo development. As in the blastocyst injection experiment, a PCR assay on genomic DNA was carried out to detect the transgene in extraembryonic versus embryonic tissues (Fig. 4A). In the 2n aggregation group, the transgene was once again detected in the extraembryonic tissues (Fig. 4A and Table 1).



Interestingly, in the 4n aggregation group, although no fetuses were recovered, tissues similar in appearance to teratomas were found to have developed in the uteri of two females (Table 1). During dissection it was noted that these teratoma-like tissues contained cartilaginous structures. Further, the transgene was detected by PCR in these tissues, and upon immunohistochemical staining, transgene-positive cells were found to have contributed to a wide variety of cell types, including tissues resembling endothelium and cartilage (Fig. 4A and data not shown). More precise tissue distribution of the transgenic RESL cells in the 2n aggregation group was then determined using immunohistochemistry (Fig. 4B). RESL cells were found to have contributed to trophoblast giant cells and to tissues of the parietal yolk sac (left panel), visceral yolk sac (central panel), and labyrinthine zone of the placenta (right panel), suggesting early and persistent contribution of RESL cells to the primitive endoderm and trophectoderm lineages of the blastocyst following aggregation. Together, these results clearly demonstrate the *in vivo* multipotency of our RESL cells using embryo aggregation methods, and confirm similar results obtained using blastocyst injections (Fig. 2C and 2D). Moreover, they demonstrate, for the first time, that the embryo/ES-like cell aggregation method described here for the rat is suitable to generate viable 2n embryo aggregates that can implant and develop normally to midgestation. This is a valuable new tool to track the cell fate and tissue contribution of putative rat ES cells *in vivo*.

#### **4.4.4 RESL Cells Display Pluripotent Capacity Via In Vitro Differentiation Into the Three Primary Germ Layers of the Embryo Proper**

We hypothesized that the bias of our RESL cells towards extraembryonic tissue contribution *in vivo* could be due to their intrinsic inability to differentiate into tissues of the three primary germ layers of the embryo proper. To test this hypothesis, the developmental capacity of RESL cells was evaluated using an *in vitro* assay of pluripotency, *in vitro* differentiation through embryoid body formation [23] (Fig. 5A). The expression of ectoderm, endoderm and mesoderm markers in the resulting differentiated cells was then analyzed. *Tubb3*, a neuroectoderm marker, was found to be expressed in rat EB-derived cells, and important proportions of cells expressed the ectoderm markers *Nestin* and *Sox1* (Fig. 5B). Endoderm markers including *Sox17* and *Foxa2* were also expressed, indicating a capacity for RESL cells to differentiate into this embryonic lineage *in vitro* (Fig. 5C). Finally, mesoderm differentiation was also observed, with a large proportion of cells expressing *Brachyury*, and multiple other mesodermal markers were also expressed, including *Sparc*, *Gata4*, and *Runx2* (Fig. 5D). Therefore, in addition to their *in vivo* multipotency, RESL cells were also able to robustly differentiate into derivatives of all three primary germ layers of the embryo *in vitro*, as demonstrated by flow cytometry, immunofluorescence and confocal microscopy, and RT-PCR. Taken together, these results suggest that RESL cells possess a much wider developmental potential than previously thought. Further, it indicates that RESL cells are not biased intrinsically to give rise exclusively to extraembryonic tissues.

#### **4.4.5 The Expression Profile of RESL Cells Before and After Differentiation Reveals Similarities to Mouse Epiblast Stem Cells and Human ES Cells**

The intriguing inability of our cells to contribute to tissues of the embryo proper *in vivo*, coupled with their capacity to robustly differentiate into derivatives of all three germ layers *in vitro* and their persistent tendency to contribute to extraembryonic tissues *in vivo*, prompted us to investigate their nature in greater detail. Recent reports of mouse epiblast stem cells (mEpiSCs) suggested that, similar to RESL cells, these pluripotent cells cannot efficiently colonize tissues of the embryo proper following blastocyst injection or embryo aggregation and embryo transfer [24, 25]. These cells can also differentiate *in vitro* to all germ layers and can be induced to develop toward extraembryonic cell fates *in vitro*, pointing to functional similarities between mEpiSCs and RESL cells [25]. In addition, human ES (hES) cells are also known to differentiate into extraembryonic cell types *in vitro* [26, 27]. Incidentally, mEpiSCs and hES cells also share multiple characteristics including similar marker expression, and are distinct from mouse ES cells [24, 25]. We therefore examined both undifferentiated RESL cells and EB-derived cells for expression of mEpiSC and hES marker genes (Fig. 6A). Surprisingly, markers of both mEpiSCs and hES cells, including *Nodal*, *Foxa2*, *Gata6*, and *Eomes*, were found to be expressed not only in undifferentiated RESL cells, but also in differentiated EB cells, showing similar marker expression between these mouse, human and rat embryonic cell populations. These results, combined with comparable pluripotent cell marker expression profile (Fig.1), suggest some

level of similarity between ES cells derived from rat and human blastocysts and mEpiSC derived from mouse epiblasts.

#### **4.4.6 RESL Cells Display Features of Heterogeneity While Maintaining Expression of Multiple Pluripotency Markers Under Conditions Favoring Differentiation**

Little is known about the specific culture requirements for maintenance of pluripotency in rat ES cells. To determine whether LIF signaling and MEFs are required for the maintenance of pluripotency markers in RESL cells, the expression of Oct4, Nanog and Sox2 proteins in undifferentiated RESL cells was compared to that in differentiated EB-derived cells by flow cytometry (Fig. 6B). The majority (71.3 %) of undifferentiated cells were found to be Oct4-positive, whereas lower proportions were positive for Nanog (17.2 %) and Sox2 (30.0 %), signifying heterogeneity within RESL cell cultures. In contrast, the proportion of cells expressing Oct4 in the differentiated EB-derived cells was greatly reduced, with 8.6 % of cells staining positive for this transcription factor. Surprisingly, the differentiated EB-derived cells not only continued to express Oct4, Nanog and Sox2 proteins after over 45 days of culture in the absence of LIF and MEFs, but the proportion of Nanog-positive cells nearly doubled (29.7 %). These results suggest that in addition to their inherent heterogeneity, RESL cells do not require LIF nor MEFs to maintain expression of pluripotency markers, revealing another important difference from mouse ES cells and further similarity with mEpiSCs and hES cells.

## 4.5 DISCUSSION

We previously postulated that RESL cells may represent cell populations having an intermediate phenotype between pluripotent epiblast and primitive endoderm [10]. Here we have tested and extended this idea by evaluating the developmental capacity of RESL cells and by demonstrating their heterogeneous nature. Indeed, when undifferentiated aggregates of RESL cells were analyzed by flow cytometry for expression of the pluripotency markers Nanog, Sox2 and Oct4, it was found that even though the majority of cells were positive for Oct4, the proportions of cells staining positive for Nanog and Sox2 were much lower (Fig.6B). Moreover, we have previously shown that when morphologically differentiated cells are selected within undifferentiated cultures of RESL cells, only about 11.5 % of these differentiated cells stain as Oct4-positive, [10] whereas here we show that the morphologically undifferentiated cells are 71.3 % Oct4-positive. This differential expression of pluripotency markers within morphologically undifferentiated RESL cells suggests firstly that undifferentiated morphology is not necessarily equivalent to undifferentiated marker expression pattern. Secondly it suggests that there exists a gradation or hierarchy of cells within RESL cell cultures, with multiple subsets of cells having different differentiation abilities. Importantly, these results demonstrate that RESL are heterogeneous populations of cells, with various subsets differing in markers expressed and proportions of cells expressing those markers. Further, this heterogeneity varies according to their growth factor environment and differentiation state. The fact that a minority of cells express Nanog or Sox2, concomitant with epiblast marker expression,

suggests the presence of a pluripotent epiblast-like compartment within undifferentiated RESL aggregates undergoing constant self-renewal, as well as yielding slightly more differentiated Oct4-positive primitive endoderm-like cells. This appears to be the best interpretation of the very stable ES-like phenotype of RESL cells observed under long-term in vitro culture (more than 6.5 consecutive months of culture) [10]. Similar cell lines from the rat epiblast have been reported in terms of in vitro differentiation capacity, sensitivity to single-cell passaging, and growth factor dependence [25]. However, in addition to their different developmental origin, the flattened, compact colony morphology of these cells and their near-homogeneous expression of pluripotency markers differs from RESL cells, and their in vivo developmental capacity is not yet known [25]. Perhaps the heterogeneous aggregates of RESL cells more accurately reflect the complex in vivo environment that rat ICM cells are subjected to in the blastocyst stage embryo, providing the appropriate cellular microenvironment to allow a small but fixed number of pluripotent cells, represented by the Nanog/Sox2-positive fraction, to survive over long-term culture. In this regard, our RESL cells provide a valuable in vitro model of rat epiblast differentiation and early rat embryo lineage segregation.

RESL cells resemble other pluripotent cell types in terms of their heterogeneous composition. In the literature there is increasing evidence of heterogeneity within mouse and human ES cell cultures [12-17]. Depending on their individual transcription factor expression profiles, some cells are more prone to displaying differentiation biases [28]. At present, it is not clear whether this heterogeneity of RESL cells could be due to the

coexistence of distinct subsets having mutually exclusive marker expression and developmental capacities, as has been reported for Nanog and Gata6 populations [17, 29], or to the labile and interchangeable nature of ES cells, with different subsets capable of converting into each other [14, 15].

Although others have reported the generation of 4n rat embryos [30, 31] and another group has attempted rat embryo/ES aggregation [9], no in vivo development has been reported so far. The developmental capacity of RESL cells was successfully analyzed using 2n and 4n embryo/RESL cell aggregation for the first time in the rat. RESL cells were found throughout the resulting blastocysts, including in the ICM, excluding the possibility that lack of integration of RESL cells into the ICM could explain absence of contribution to embryonic tissues later on during gestation. Further, following embryo transfer, it was found that RESL cells had contributed to multiple developmentally distinct extraembryonic lineages. We have therefore demonstrated the validity and utility of a novel approach in the rat which simultaneously allows the evaluation of the role played by the host embryo developmental stage, the in vivo developmental capacity of RESL cells, and the subsequent tracking of cell fate and tissue contribution of putative rat ES cells in vivo.

It is clear that the RESL cells described here express multiple markers of pluripotency (Fig.1 and Fig. 6B), similar to other pluripotent cell types such as mouse and human ES cells. Other groups have also recently derived rat ES or RESL cells that display pluripotent marker expression, and these reports have helped elucidate possible signaling pathways

involved in pluripotency maintenance of rat ES cells [6, 7, 9, 32, 33]. It seems likely that failure to select the appropriate minority of pluripotent cells within our RESL cultures explains the lack of embryonic contribution in vivo after reintroduction into host embryos, yet the retained ability to differentiate into all three embryonic germ layers. Perhaps slightly more differentiated cells, rather than the pluripotent cells within undifferentiated RESL cultures, were selected. Although it is currently unknown whether the rat ES or RESL cells obtained by other groups are also heterogeneous, it may be that their absence or low efficiency of contribution to embryonic tissues and particularly the germline in chimeras may be due to their heterogeneous composition and to selection of slightly less pluripotent cells within their populations before reintroduction into embryos [6, 7, 9]. It is also possible that even though the selected RESL cells described herein had integrated into the ICM, perhaps they had not yet had time to segregate into primitive endoderm and early epiblast components at the time they were examined, and that the RESL cells were subsequently excluded from the epiblast and resultant embryonic tissues [29].

The role of signaling pathways involved in maintenance of pluripotency in RESL cells is currently unclear. Upon in vitro differentiation of RESL cells into EB-derived cells, and following prolonged culture in the absence of LIF and MEFs, the expression of pluripotency and epiblast stem cell markers was not abolished. This points to important differences in signaling pathways involved in pluripotency maintenance in RESL cells when compared to mouse ES cells, and reveals further similarities to human ES cells and mEpiSCs, which require fibroblast growth factor and activin rather than LIF signaling to



self-renew [24, 25, 27, 34]. Our results open a door to deciphering the role of signaling pathways involved in pluripotency maintenance of RESL cells. An interesting approach would be to evaluate whether RESL cells can be reprogrammed by the growth factor environment to full pluripotency, as has been shown recently in the mouse [35].

#### **4.6 CONCLUSION**

Our results provide new insight into the nature of RESL cells and their *in vivo* function by demonstrating their inherent heterogeneity, and provide important clues as to why embryonic and germline contribution of rat ES cells has been so difficult to achieve. The knowledge gained through this study has important implications for the elucidation of the precise mechanisms governing RESL cell pluripotency. It will accelerate our understanding of culture conditions required to obtain and maintain undifferentiated pluripotent rat ES cells that are able to efficiently colonize not only embryonic tissues but also the germline, a prerequisite to the generation of knockout rats.

#### **4.7 ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Dr Janet Rossant for helpful discussions, Dr Bruce D. Murphy for critical reading of the manuscript, Carmen Léveillé for technical assistance, Dr Jae Gyu Yoo and Li Lian for assistance with blastocyst injection and embryo transfer, and Dr Guy Beauchamp for statistical analysis. Support for this work was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (Industrial Postgraduate

Scholarship to S.-P. Demers), by Clonagen inc., and by the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

#### 4.8 REFERENCES

1. Aitman TJ, Critser JK, Cuppen E et al. Progress and prospects in rat genetics: a community view. **Nat Genet** 2008;40:516-522.
2. Bugos O, Bhide M, Zilka N. Beyond the Rat Models of Human Neurodegenerative Disorders. **Cell Mol Neurobiol** 2009.
3. Tesson L, Cozzi J, Menoret S et al. Transgenic modifications of the rat genome. **Transgenic Res** 2005;14:531-546.
4. Gill TJ, 3rd, Smith GJ, Wissler RW et al. The rat as an experimental animal. **Science** 1989;245:269-276.
5. Jacob HJ. Functional genomics and rat models. **Genome Res** 1999;9:1013-1016.
6. Buehr M, Meek S, Blair K et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. **Cell** 2008;135:1287-1298.
7. Li P, Tong C, Mehrian-Shai R et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. **Cell** 2008;135:1299-1310.
8. Buehr M, Nichols J, Stenhouse F et al. Rapid loss of Oct-4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines. **Biol Reprod** 2003a;68:222-229.
9. Ueda S, Kawamata M, Teratani T et al. Establishment of rat embryonic stem cells and making of chimera rats. **PLoS ONE** 2008;3:e2800.

10. Demers SP, Yoo JG, Lian L et al. Rat Embryonic Stem-Like (ES-Like) Cells Can Contribute to Extraembryonic Tissues In Vivo. **Cloning Stem Cells** 2007;9:512-522.
11. Demers SP, Smith, L.C. Derivation, culture, and in vivo developmental capacity of embryonic cell lines from rat blastocysts. In: Anegon I, ed: Rat genomics: gene identification, functional genomics and model applications:Methods in Molecular Biology.Humana Press; *in press* - 2010.
12. Enver T, Soneji S, Joshi C et al. Cellular differentiation hierarchies in normal and culture-adapted human embryonic stem cells. **Hum Mol Genet** 2005;14:3129-3140.
13. Stewart MH, Bosse M, Chadwick K et al. Clonal isolation of hESCs reveals heterogeneity within the pluripotent stem cell compartment. **Nat Methods** 2006;3:807-815.
14. Chambers I, Silva J, Colby D et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. **Nature** 2007;450:1230-1234.
15. Hayashi K, Lopes SM, Tang F et al. Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. **Cell Stem Cell** 2008;3:391-401.
16. Toyooka Y, Shimosato D, Murakami K et al. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. **Development** 2008;135:909-918.
17. Singh AM, Hamazaki T, Hankowski KE et al. A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. **Stem Cells** 2007;25:2534-2542.

18. Nagy A. Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.
19. Mayer JF, Jr., Fritz HI. The culture of preimplantation rat embryos and the production of allophenic rats. **J Reprod Fertil** 1974;39:1-9.
20. Miyoshi K, Kono T, Niwa K. Stage-dependent development of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium after fertilization in vivo and in vitro. **Biol Reprod** 1997;56:180-185.
21. Desmarais JA, Lopes FL, Zhang H et al. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates trophoblast cell differentiation in mink (*Mustela vison*). **Biol Reprod** 2007;77:829-839.
22. Nagy A, Rossant J, Nagy R et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993;90:8424-8428.
23. Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers. **Differentiation** 1991;48:173-182.
24. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. **Nature** 2007;448:196-199.
25. Brons IG, Smithers LE, Trotter MW et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. **Nature** 2007;448:191-195.

26. Xu RH, Chen X, Li DS et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. **Nat Biotechnol** 2002;20:1261-1264.
27. Rossant J. Stem cells and early lineage development. **Cell** 2008;132:527-531.
28. Graf T, Stadtfeld M. Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. **Cell Stem Cell** 2008;3:480-483.
29. Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T et al. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. **Dev Cell** 2006;10:615-624.
30. Krivokharchenko A, Galat V, Ganten D et al. In vitro formation of tetraploid rat blastocysts after fusion of two-cell embryos. **Mol Reprod Dev** 2002;61:460-465.
31. Shinozawa T, Sugawara A, Matsumoto A et al. Development of rat tetraploid and chimeric embryos aggregated with diploid cells. **Zygote** 2006;14:287-297.
32. Vassilieva S, Guan K, Pich U et al. Establishment of SSEA-1- and Oct-4-expressing rat embryonic stem-like cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth. **Exp Cell Res** 2000;258:361-373.
33. Li C, Yang Y, Gu J et al. Derivation and transcriptional profiling analysis of pluripotent stem cell lines from rat blastocysts. **Cell Res** 2009;19:173-186.
34. Xu RH, Peck RM, Li DS et al. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. **Nat Methods** 2005;2:185-190.

35. Chou YF, Chen HH, Eijpe M et al. The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell* 2008;135:449-461.

## 4.9 FIGURES AND TABLES

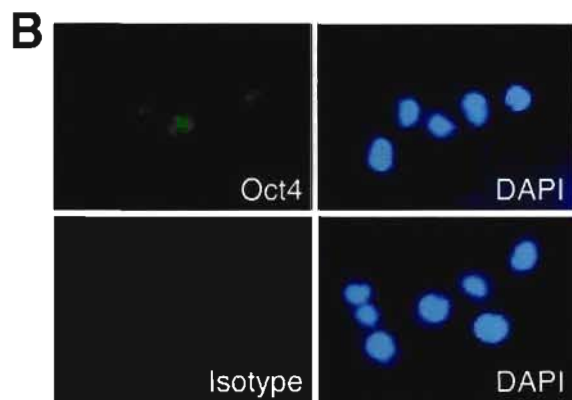
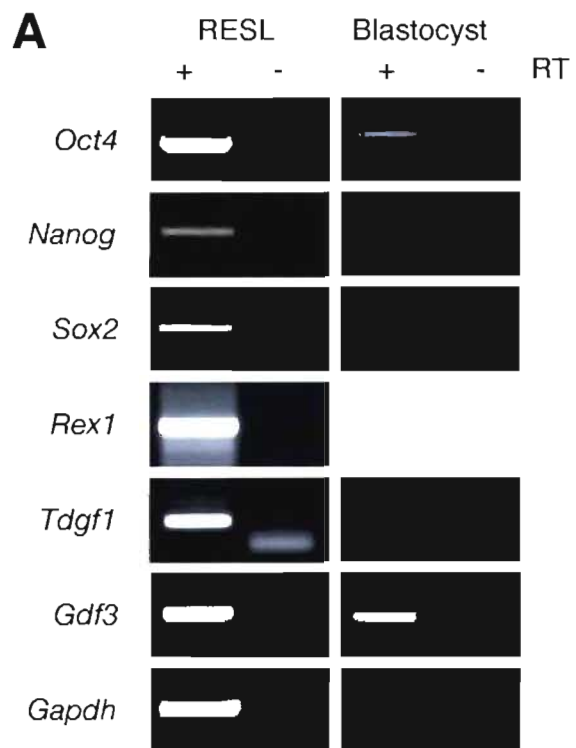
TABLE 4.1 In vitro and in vivo development of rat 2n and 4n embryo aggregates

Group	Total embryos cultured	Embryos developed to morula/blastocyst stage	In vitro development rate (%) (p=0.30) <sup>a</sup>	Implanted embryos per transferred embryos (p=1) <sup>a</sup>	In vivo development to E14 per implanted embryos (p=0.17) <sup>a</sup>	Tissue contribution of rat embryonic stem-like cells to E14 fetuses
Control	51	49	96	7/16	1/7	Not applicable
2n aggregation	137	131	96	51/108	2/51	1/2
4n aggregation	58	58	100	22/48	0/22	Teratoma

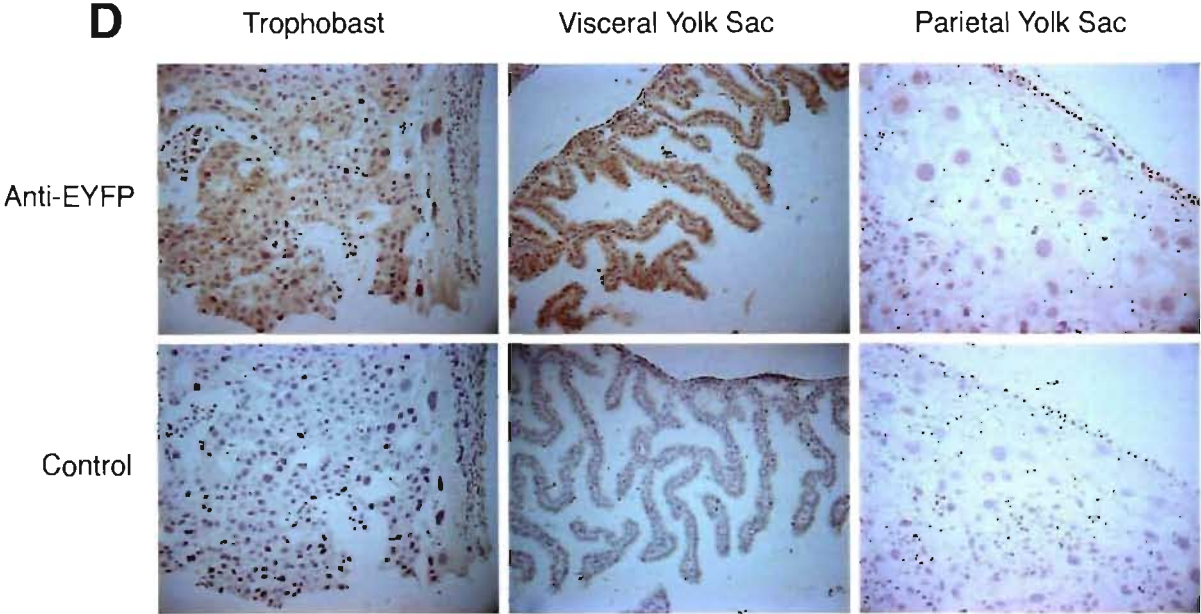
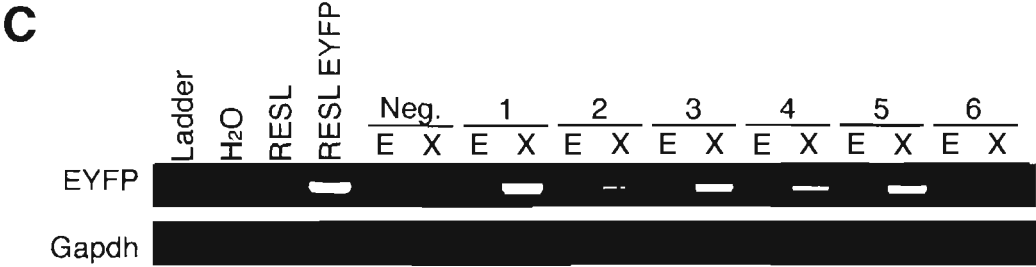
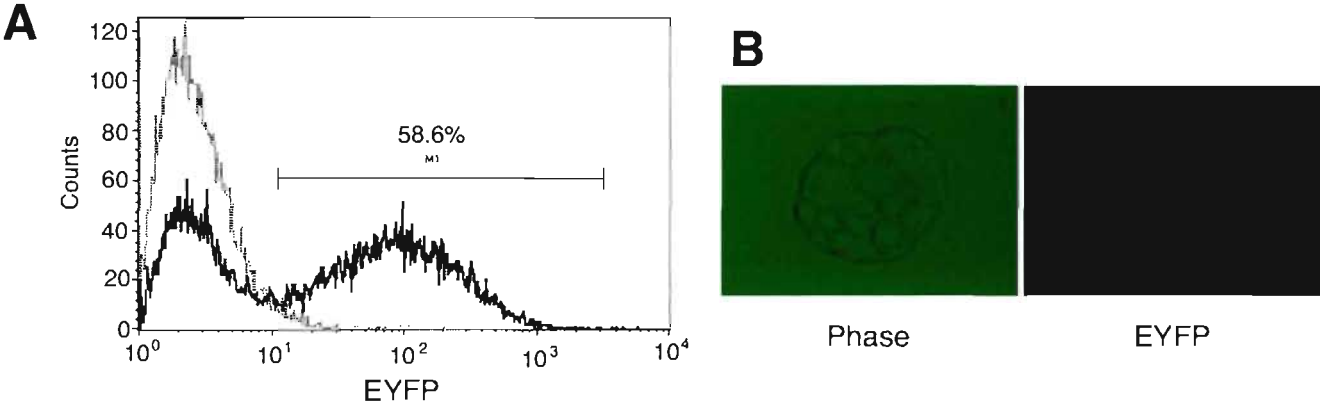
<sup>a</sup>: chi-square exact test

Abbreviations: 2n, diploid; 4n, tetraploid; E, embryonic day.





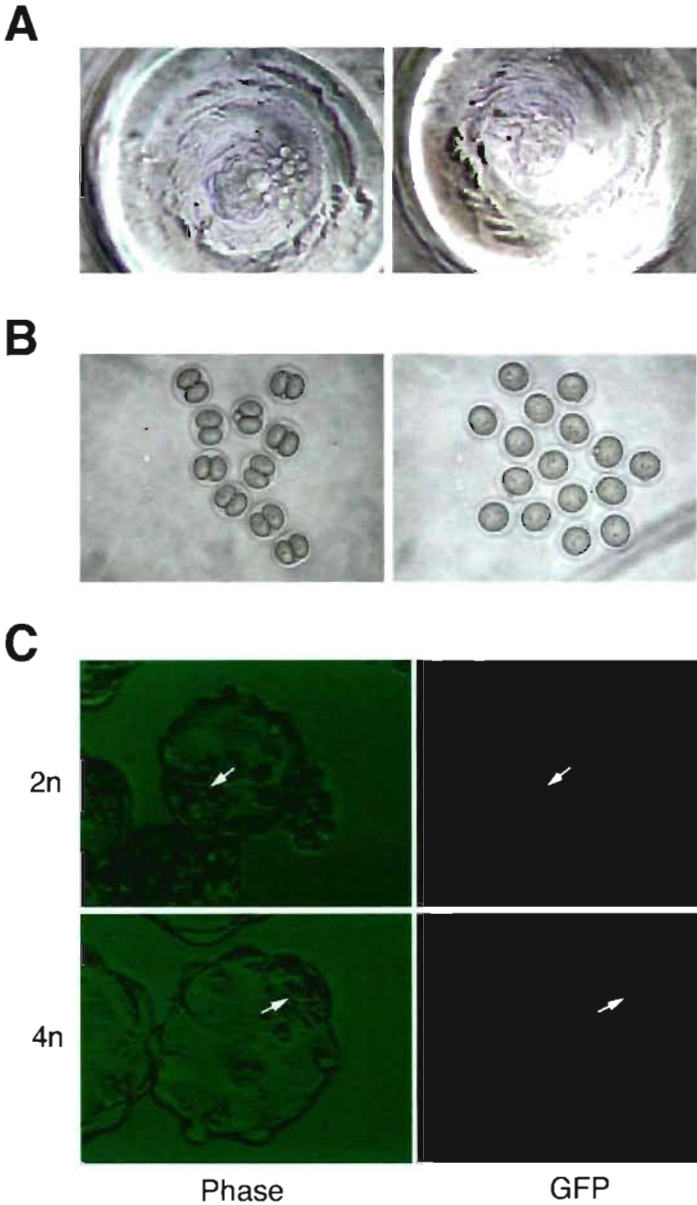
**Figure 4.1** Undifferentiated RESL cells express multiple pluripotent cell markers. (A): RT-PCR analysis showing that transcripts found in pluripotent human and mouse embryonic stem cells are also expressed in RESL cells. Left column: RESL cells. Right column: rat blastocysts. (B): Nuclear localization of Oct4 protein in RESL cells, with corresponding DAPI nuclear staining and isotype control. Magnification, X400. Abbreviations: RESL, rat embryonic stem-like; -RT, reaction without reverse transcriptase; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.



**Figure 4.2** Cell fate analysis reveals *in vivo* multipotency of RESL cells. (A): Flow cytometric analysis of transgene expression in RESL EYFP cells. Thin line, non-transgenic cells; Bold line, RESL EYFP cells. (B): RESL EYFP cells fluorescing immediately following blastocyst injection. Magnification, X100. (C): PCR assay on genomic DNA for detection of EYFP in tissues at E17.5 following embryo transfer. (D): Immunohistochemistry for analysis of tissue distribution reveals contribution of RESL EYFP cells to multiple developmentally distinct lineages *in vivo*. Magnification, X200. Abbreviations: EYFP, enhanced yellow fluorescent protein; H<sub>2</sub>O, no template; RESL, rat embryonic stem-like; E, embryonic tissues; X, extraembryonic tissues; Neg., wild-type negative control fetus.

Figure 3. Demers, SP

top

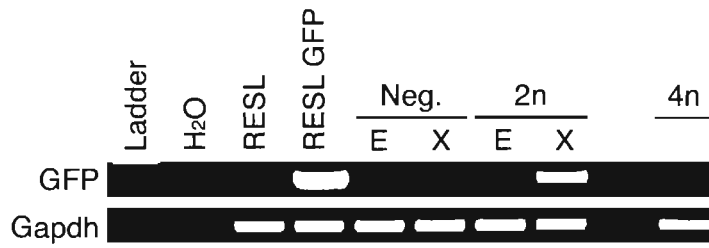


**Figure 4.3** Generation of diploid (2n) and tetraploid (4n) embryo aggregates with RESL cells. (A): View within a culture micro-well showing 2n aggregation using a denuded rat eight-cell embryo and a clump of RESL cells (left panel). Blastocyst formed after 36h of in vitro culture (right panel). Magnification, X200. (B): Rat 2n two-cell embryos before (left panel) and 30 minutes after electrofusion to produce 4n one-cell embryos (right panel). Magnification, X100. (C): Transgene-expressing RESL cells are found throughout blastocysts derived from 2n and 4n aggregates. Arrows denote the inner cell mass. Magnification, X400. Abbreviations: RESL, rat embryonic stem-like; GFP, green fluorescent protein.

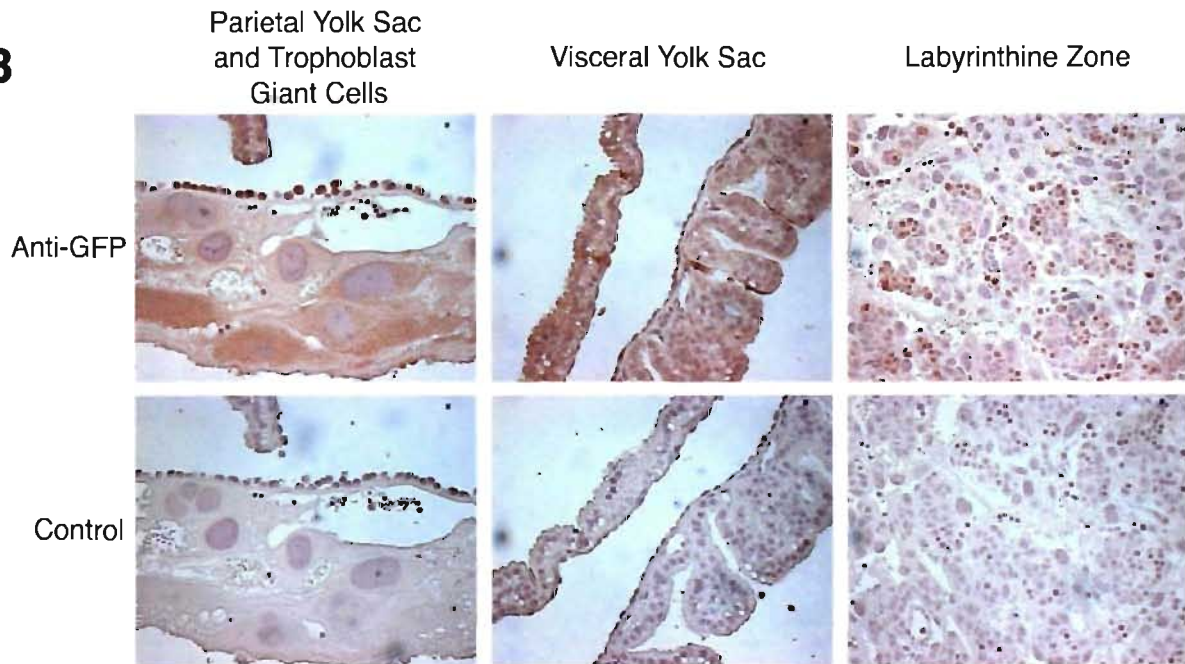
Figure 4. Demers, SP

top

**A**



**B**

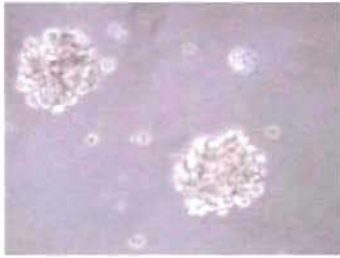


**Figure 4.4** In vivo multipotency of RESL cells following aggregation and embryo transfer. (A): PCR assay on genomic DNA for detection of GFP in tissues at E14. (B): Immunohistochemistry for analysis of tissue distribution reveals contribution of RESL GFP cells to multiple developmentally distinct lineages in vivo. Magnification, X400. Abbreviations: GFP, green fluorescent protein; H<sub>2</sub>O, no template; RESL, rat ES-like; E, embryonic tissues; X, extraembryonic tissues; Neg., wild-type negative control fetus; 2n, Tissues derived from diploid host embryo aggregate; 4n, Tissues derived from tetraploid host embryo aggregate.

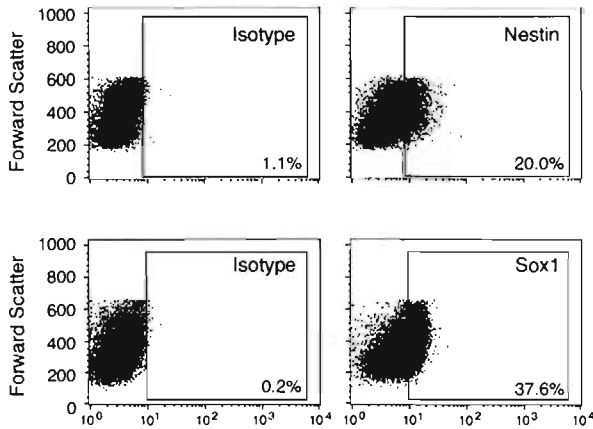


Figure 5. Demers, SP

**A**

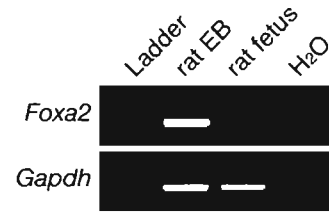
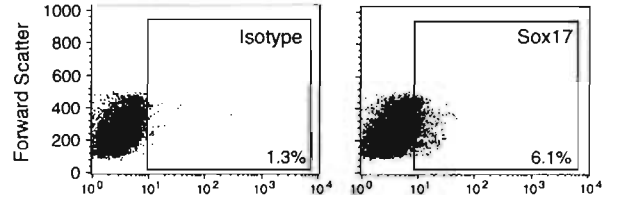


**B**

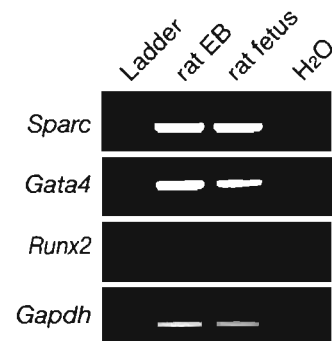
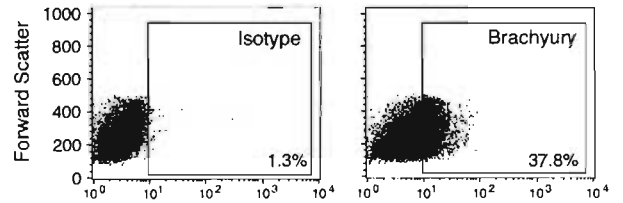


**C**

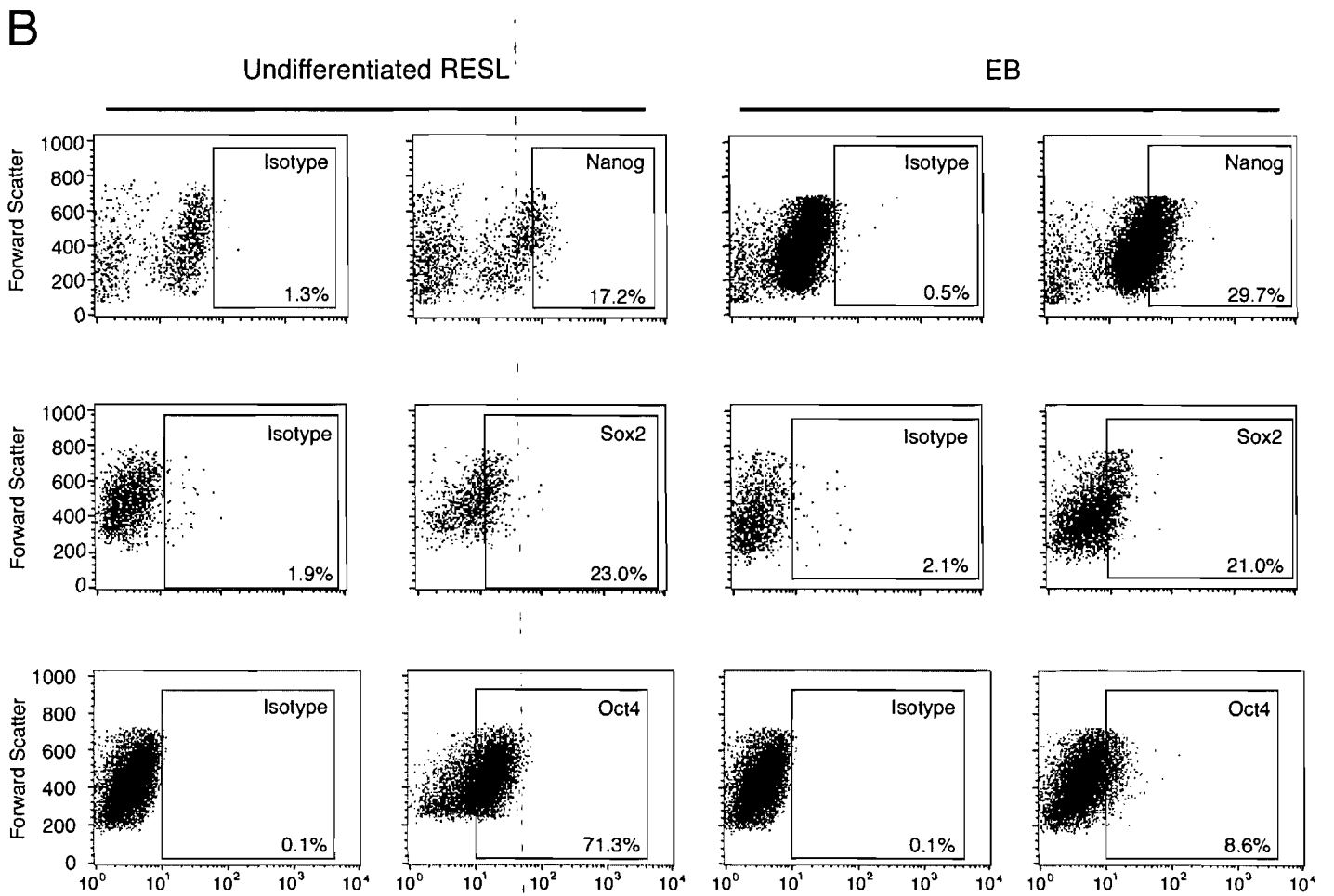
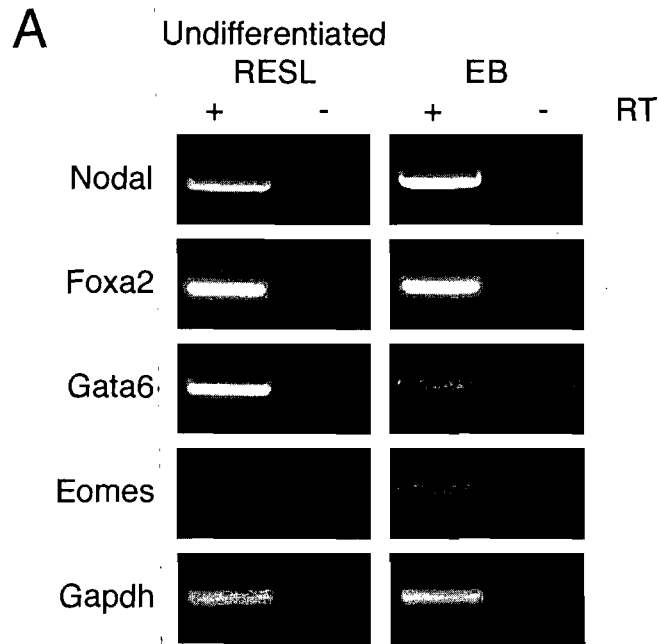
top



**D**



**Figure 4.5** In vitro pluripotency of RESL cells via differentiation into the three primary embryonic germ layers. (A): Embryoid bodies formed from RESL cells. Magnification, X200. (B): Immunofluorescence analysis (green, top) and flow cytometry (bottom) showing expression of multiple ectoderm markers using anti-Nestin, anti-Sox1, and anti-Tubb3 primary antibodies. (C): Immunofluorescence analysis (green, top), flow cytometry (middle), and RT-PCR (bottom) showing expression of endoderm markers Sox17 and Foxa2. (D): Immunofluorescence analysis (green, top), flow cytometry (middle), and RT-PCR (bottom) showing expression of mesoderm markers Brachyury, Sparc, Gata4, and Runx2. Magnification, X400. Abbreviations: RESL, rat embryonic stem-like; EB, embryoid body; H<sub>2</sub>O, no template.



**Figure 4.6** Epiblast and pluripotent marker expression profile of RESL cells under differentiation-inducing conditions reveals their culture requirements and heterogeneity. (A): RT-PCR analysis showing expression of a panel of markers of mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells in undifferentiated RESL cells (left). EB cells (right) continue to express marker transcripts despite 45 days of culture in the absence of leukemia inhibitory factor and mouse embryonic fibroblasts. (B): Heterogeneity of undifferentiated RESL cells (left) shown by differential expression of pluripotency markers by flow cytometry, with small proportions of cells expressing Nanog and Sox2, and a large proportion expressing Oct4. Sustained expression of these pluripotency markers in EB cells after 45 days of culture under differentiation-inducing conditions (right). Abbreviations: RESL, rat embryonic stem-like; -RT, reaction without reverse transcriptase; EB, embryoid body-derived RESL cells.

## 5.0 ARTICLE TROISIÈME

### **Retention of pluripotency and delayed pre-implantation development in rat blastocyst outgrowths under MEK and GSK3 inhibition**

Simon-Pierre Demers<sup>1,2</sup>, Joëlle A. Desmarais<sup>1,2</sup>, Patrick Vincent<sup>1</sup> and Lawrence C. Smith<sup>1</sup>

#### **Address**

<sup>1</sup> Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6. <sup>2</sup> These authors contributed equally to this work.

**Running head: Combined MEK and GSK3 inhibition maintains pluripotency of rat embryonic cells**

All correspondence should be addressed to Simon-Pierre Demers, Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6. Tel: [REDACTED]

[REDACTED]

## 5.1 ABSTRACT

**Background:** Access to germline-competent embryonic stem (ES) cells and to efficient gene-targeting technologies in the rat would greatly improve our understanding of a number of complex diseases shared by rats and humans and facilitate the development of therapies. Improved understanding of fundamental characteristics defining early developmental events in the rat embryo *in vivo* would help in deciphering the role of specific signalling pathways involved in pluripotency maintenance in this species. The application of this knowledge to the process of ES cell derivation would allow the manipulation of cell fate *in vitro* and permit the culture and expansion of pluripotent, germline-competent rat ES cells.

**Results:** Using systematic verification of individual parameters influencing pluripotent cell survival in rat blastocyst primary outgrowths, we demonstrate for the first time the retention of pluripotent cells under conventional culture conditions used for ES derivation, in combination with MEK and GSK3 inhibitors, and the localization of these pluripotent cells within primary outgrowths. Further, we delineate the individual roles played by these two inhibitors in early lineage decisions during the process of rat ES cell derivation.

**Conclusions:** The examination of the role of these pathways in early lineage decisions both in the rat embryo and during primary outgrowth formation offers a unique approach to deciphering molecular events involved in lineage choice in this species. Together, these results will help in the development of conditions that favor the proliferation and culture of pluripotent rat ES cells for use in gene-targeting procedures.

## 5.2 BACKGROUND

Access to germline-competent embryonic stem (ES) cells and to efficient gene-targeting technologies in the rat would greatly improve our understanding of a number of complex diseases shared by rats and humans and facilitate the development of therapies [1, 2]. Recent developments in rat ES cell derivation have opened a door to this possibility [3, 4]. In turn, achievement of gene-targeting through the use of rat ES cells will rely on a clear identification of the factors involved in the maintenance of their in vitro and in vivo pluripotency. Enhanced appreciation of the roles played by these factors during embryonic development in the rat, a species of major importance to biomedical research, would be helpful in this regard.

Currently, there is very limited knowledge of molecular events involved in the development of the rat pre-implantation embryo and of the timing and mechanisms of early lineage segregation. Improved understanding of fundamental characteristics defining early developmental events in the rat embryo in vivo would help in deciphering the role of specific signalling pathways involved in pluripotency maintenance in this species. The application of this knowledge to the process of ES cell derivation would allow the manipulation of cell fate in vitro and permit the culture and expansion of pluripotent, germline-competent rat ES cells.

Recent experiments in the mouse have implicated the MAPK signalling pathway as being required for pre-implantation development [5] and as promoting trophectoderm (TE) formation in mouse embryos and ES cells [6]. Previous experiments in the mouse and

human have also implicated the MAPK and Wnt signalling pathways in the maintenance of self-renewal and pluripotency of ES cells [7-9]. Recent reports in both the mouse and the rat have suggested that inhibition of the MAPK pathway using MEK inhibitors, concomitant with activation of the Wnt pathway using GSK3 inhibitors may aid in blocking differentiation of ES cells[3, 4, 10]. However, at present, the role of the MAPK and Wnt pathways in maintaining pluripotency during the initial phases of derivation of ES cells from rat blastocysts has not been reported.

We have recently reported that rat embryonic stem-like (RESL) cells can contribute to multiple developmentally distinct tissues *in vivo* following blastocyst injection and embryo aggregation. Further, these cells express multiple pluripotency markers similar to mouse and human ES cells, can generate embryoid bodies and differentiate into all three primary embryonic germ layers *in vitro*, and are heterogeneous populations [11, 12]. This latter characteristic renders the identification of pluripotent cells within cultures difficult, and may be an important contributing factor in the lack of embryonic contribution *in vivo*. To test the hypothesis that the inherent heterogeneity of RESL cells could be due to heterogeneity of the starting population for derivation of rat ES cells, surrogate marker expression of pluripotent inner cell mass (ICM) and primitive endoderm (PrE) lineages of the blastocyst was examined in primary outgrowths under *in vitro* culture. Further, we determined that inhibition of the MAPK pathway and activation of the Wnt pathway through GSK3 inhibition during the initial phases of derivation can permit the selective survival of the pluripotent lineage *in vitro* and more homogeneous cell populations. The knowledge gained through these experiments will accelerate the development of conditions



yielding high proportions of pluripotent germline-competent rat ES cells for use in the efficient generation of knockout rats.

## 5.3 METHODS

### 5.3.1 Animals and Embryo Recovery

All protocols using live animals were approved by the Comité d'Éthique de l'Utilisation des Animaux de l'Université de Montréal, and were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Fischer (F344) embryos were obtained by mating of female and male F344 rats, purchased from Charles River Canada (St-Constant, QC, Canada). Noon the day after mating, when the presence of spermatozoa in the vaginal smears was detected, was considered to be 0.5 day post-coitum (dpc). At 4.5 dpc, embryos were flushed from the uteri with flushing medium consisting of DMEM, 10% charcoal-treated FBS, 25mM HEPES buffer, 100 IU/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin, all from Invitrogen (Burlington, ON, Canada).

### 5.3.2 RNA Isolation and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RNA from 6 pooled rat blastocysts at 4.5 dpc was isolated using a RNeasy micro kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. The RT-PCR protocol and primer sequences used are described in Demers et al.[12]. As a control for genomic DNA contamination, water (H<sub>2</sub>O) was used in the PCR reaction mix instead of cDNA. *Gapdh* was used as a housekeeping gene. PCR products were separated on a 1.5%

(w/v) agarose gel electrophoresis containing 0.1% (v/v) ethidium bromide to visualize PCR products.

### 5.3.3 Embryo Culture and Treatments

Zonae pellucidae of embryos were removed by incubation in 1% acid tyrode (Sigma, St-Louis, MO, USA) for a few seconds. Denuded embryos were placed in culture in 8-well Lab-Tek II CC2 chamber slides (Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA) previously seeded with mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) as described in Demers et al. [11]. The culture medium, Rat ES medium, has been described previously [11, 13]. Serum-free Rat ES medium consisted of Rat ES medium in which the 10% v/v charcoal-treated FBS was replaced by 10% v/v Knockout Serum Replacement. Leukemia inhibitory factor (LIF) (ESGRO, Chemicon International, Temecula, CA) was added to each medium at a concentration of 2  $\mu$ l/ml (2000 U/ml) just before use. Unless otherwise stated, all the reagents for cell culture were from Invitrogen. U0126, BIO and its kinase-inactive analog MeBIO were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA), and PD98059 from Sigma. Outgrowth morphology was evaluated 96h after initiation of blastocyst culture, with an inverted Nikon Eclipse TS100 microscope (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada). Brightfield phase contrast micrographs were taken with a Nikon CoolPIX 990 camera (Nikon Canada). Outgrowth morphology was scored according to presence or absence of TE, PrE, epithelial cells and internal vesicle within the outgrowth. Measures of the long diameter of the internal vesicle and of the compact outgrowth were calculated for each embryo, when these features were present. For in vitro embryo

development experiments, intact 8-cell stage embryos were cultured in mR1ECM, a medium optimized for rat embryo development [14], either in the presence of 20  $\mu$ M U0126 or vehicle control (DMSO).

#### **5.3.4 Immunofluorescence**

Outgrowths and 4.5 dpc rat blastocysts were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) for 15 min at room temperature (RT). Fixation was followed by three washes in phosphate-buffered saline-tween 0.05% (PBST). Permeabilization with 0.1% Triton-PBS was conducted overnight at 4C. Blocking was carried out for 1h at RT in blocking solution consisting of 4% normal goat serum (Sigma) in 1X PBS. Double-labelling immunofluorescence was carried out overnight at 4C in a humid chamber using a cocktail of Oct4 mouse monoclonal antibody (C-10, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) 1:50 (4 $\mu$ g/ml) and Gata6 rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz, H-92) 1:50 (4 $\mu$ g/ml). To eliminate the possibility of obtaining signals from non-specific binding of the antibodies used in this study, a cocktail of the following isotypes was used as negative control: mouse IgG<sub>2b</sub> 1:25 (4  $\mu$ g/ml) and rabbit IgG 1:500 (4  $\mu$ g/ml, Upstate, Temecula, CA, USA). Primary antibodies were washed three times for 5 min each in PBST. This was followed by 1 hour incubation with a cocktail of secondary antibodies prepared with anti-mouse Alexa Fluor 488 and anti-rabbit Alexa Fluor 594 at 1:1000 dilution (Invitrogen). All antibodies were diluted in the blocking solution. Blastocysts and outgrowths were washed three times in PBST and placed in Slow-Fade Gold mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen) before being

visualized using an Olympus FV 1000 laser-scanning confocal microscope (Olympus Canada, Markham, ON, Canada), and image analysis was carried out with Olympus Fluoview software FV-10 ASW (Olympus Canada).

### **5.3.5 Statistical Analyses**

Significant differences between mean outgrowth diameters, mean internal vesicle diameters, and mean ratios of internal vesicle diameter/outgrowth diameter were detected by least-square ANOVA. When significant differences were found, means were compared using a student T-test. Significance was considered when the probability ( $P$ ) > 0.05. Statistical analysis was carried out using the JMP 5.0.1a software (SAS Institute, Cary, NC).

## **5.4 RESULTS**

### **5.4.1 Early lineage markers of ICM, TE, and PrE are expressed in the pre-implantation rat embryo**

Little is known about the timing and mechanisms of lineage segregation events in the rat pre-implantation embryo. To ascertain whether the rat 4.5 dpc blastocyst expresses markers of the pluripotent ICM, as well as markers of TE and PrE tissues known to be expressed in the mouse pre-implantation blastocyst, the presence of *Oct4*, *Nanog*, *Cdx2*, *Gata4*, *Foxa2* and *Sparc* transcripts in pooled 4.5 dpc rat blastocysts was examined by RT-PCR. The pluripotency marker genes *Oct4* and *Nanog* were found to be expressed, and transcripts for *Cdx2* and *Gata4*, markers of TE and PrE respectively, were also present (Fig. 1A). On the

other hand, the parietal endoderm marker *Sparc* and the visceral endoderm marker *Foxa2* were not detected, indicating that at 4.5 dpc the PrE has not yet begun to differentiate into visceral and parietal endoderm lineages, similar to what is observed in the mouse at the equivalent stage of development[15]. Immunofluorescence was then conducted to gain more precise insight into the localization of Oct4 protein within 4.75 dpc rat blastocysts (n=3). While Oct4 protein was seen to fluoresce brightly in the ICM, a weak signal was also detected in the TE (Fig. 1B). No signal was observed in the corresponding isotype control.

#### **5.4.2 Morphological differences in blastocyst primary outgrowths cultured in the absence of serum**

Primary outgrowth of blastocysts is one of the crucial initial steps in the derivation of ES cell lines. To determine the effect of serum on the morphological characteristics of primary outgrowths, 4.5 dpc rat blastocysts were placed on a feeder layer composed of MEFs, and following in vitro culture for 96h in the presence of serum (n=12) or the absence of serum (n=12), the morphology of individual outgrowths was evaluated (Fig. 2). Primary outgrowths of both groups shared some morphological characteristics; a three-dimensional dome-shaped outgrowth composed of an internal vesicle enclosed within extracellular matrix and surrounded by multiple layers of tightly packed cells and an underlying sheet of trophoblast cells (Fig. 2). Although the outgrowths in the serum-free group were visibly smaller, no significant differences were observed regarding either the

presence or size of the internal vesicle (data not shown). However, in the group where serum was added to the culture medium, the tightly packed cells surrounding the internal vesicle formed a prominent dome-like structure, whereas in the absence of serum, growth of these cells was clearly inhibited. This suggests that the absence of serum does not interfere with the growth of cells forming the internal vesicle, but importantly, points to a role of serum in promoting the growth of the tightly packed cells immediately surrounding the vesicle and forming the dome-like structure.

#### **5.4.3 MEK inhibition increases the relative size of internal vesicles within primary blastocyst outgrowths**

Serum is known to be a potent activator of the MAPK pathway [16]. To determine whether the growth of cells immediately surrounding the internal vesicle in primary blastocyst outgrowths is modulated by MEK, a pharmacological inhibitor of MEK, PD98059, was added to serum-containing Rat ES medium at different concentrations (25 and 50  $\mu\text{M}$ ), and DMSO was used as the vehicle control. As in the previous experiment, the morphology of primary outgrowths was examined 96h after plating (Fig. 3A). Although the size of outgrowths was similar in all groups, a significant and perhaps functionally important difference was found in the group of embryos treated with 50  $\mu\text{M}$  PD98059; this dose yielded a significantly larger ratio of vesicle diameter / outgrowth diameter compared to DMSO (Fig. 3B). No apparent effect on trophoblast cells was observed, as the underlying sheet of trophoblast was present in all three groups. This demonstrates that

inhibition of the MEK pathway in the presence of serum increases the relative size of the internal vesicles in outgrowths, and does not impair trophoblast maintenance.

#### **5.4.4 Inhibition of MEK in the absence of serum inhibits the formation of internal vesicles and the presence of exclusively Oct4-positive cells**

Based on this initial set of experiments, we hypothesized that cells localized within the internal vesicle of outgrowths were the most pluripotent cells, and that an increased internal vesicle size would be beneficial during the initial stages of rat ES cell derivation. Since MAPK inhibition especially increased the relative size of outgrowths at higher doses, a more specific pharmacological inhibitor of MEK, U0126, was used from this point on and its effects on morphological and molecular characteristics of the outgrowths were examined 96h after plating. In the presence of serum, the mean diameter of outgrowths was similar in the group treated with the control or 20  $\mu$ M U0126. As in the case of PD98059 treatment with serum, outgrowths under 20  $\mu$ M U0126 treatment with serum displayed larger internal vesicle size (Fig. 4A). However, in the absence of serum, no internal vesicle formed with U0126 treatment (n=4), suggesting that MEK is involved in the formation and / or maintenance of cells composing the internal vesicle. Next, immunofluorescence for detection of Oct4 and Gata6 proteins was used to gain better insight into the lineage composition of outgrowths and to determine the localization of pluripotent cells within outgrowths under MEK inhibition without serum (Fig. 4B). In the control group, clusters of exclusively Oct4-positive cells were localized inside the internal vesicle or in the immediate vicinity, while Gata6-positive cells were found at the periphery of the

outgrowth. Low levels of Oct4 and Gata6 co-localization in the same cells were observed in some cells at the periphery of the outgrowth, but in the immediate region of the internal vesicle, exclusively Oct4-positive cells were found. This indicates that the precursors of rat ES cells are localized to the internal vesicle, or within its immediate proximity, while PrE cells expressing Gata6 are localized to the periphery of the outgrowth. In the presence of U0126, cells exclusively positive for Oct4 were not present in any of the outgrowths examined. Instead, Oct4 and Gata6 co-expression within the same cells was observed consistently, indicating that U0126 promotes the proliferation of PrE cells at the expense of pluripotent cells. Interestingly, trophoblast giant cells were present in all groups, including under treatment with U0126, further suggesting that MEK is not required for the maintenance of this lineage during outgrowth formation.

#### **5.4.5 U0126 inhibits progression of rat embryos to the blastocyst stage during in vitro development**

To determine whether MEK regulates developmental events during rat pre-implantation embryo development, 8-cell stage rat embryos were collected and cultured for 36h with U0126 or with vehicle control. At 24 and 36h, embryonic development was observed and scored (Table 1). At 36h, in the control group, 3 blastocysts (50%, n=6) and 1 morula (17%, n=6) were observed, whereas in the U0126-treated group, only 1 blastocyst (17%, n=6) and 4 morulae (67%, n=6) were seen to have developed. These preliminary observations may suggest that U0126 causes developmental arrest at the morula stage and inhibits blastocoele formation in the rat pre-implantation embryo.



#### **5.4.6 Simultaneous inhibition of GSK3 and MAPK acts synergistically to promote internal vesicle formation, proliferation and retention of exclusively Oct4-positive cells in the presence of serum**

To define the role of GSK3 inhibition during the initial stages of rat ES cell derivation, the outgrowth morphology, as well as the presence of Oct4 and Gata6 proteins by double-labelling immunofluorescence, were examined in outgrowths treated with BIO, a GSK3 inhibitor, and compared to the negative control, MeBIO. Alone, 5  $\mu$ M BIO was found to have no significant positive effect on the retention of Oct4-positive cells within the outgrowth, and no evident morphological differences in the outgrowths were observed between the control and the treatment (Fig. 5). In fact, BIO treatment with serum abolished Oct4 expression. In the serum-free group, BIO treatment increased the number and intensity of Gata6-positive cells, and reduced that of Oct4-positive cells. Interestingly, Gata6-positive cells were more evident in the serum-free groups than the serum-containing groups. Therefore, GSK3 inhibition alone, especially in the absence of serum, appears to promote PrE formation rather than maintenance of pluripotent cells.

When both U0126 and BIO treatments were combined in the presence of serum, the ratio of internal vesicle diameter / outgrowth diameter was higher than in the DMSO+MeBIO control (Fig. 6A and data not shown). In the presence of both inhibitors, exclusively Oct4-positive cells were detected at a higher frequency in all the outgrowths analyzed when compared to the control group, in a pattern approximating the outline of the internal vesicle in the majority of outgrowths (67%, n=3) (Fig. 6B). This suggests that in the presence of

serum, both inhibitors act synergistically to promote the maintenance of the precursors of rat ES cells situated in the immediate proximity of the internal vesicle.

In the absence of serum, a compact outgrowth morphology was observed in the DMSO+MeBIO control, whereas in the presence of both inhibitors, a flatter and more dispersed morphology was promoted (Fig. 6A). By immunofluorescence analysis, Oct4-positive cells were detected in a small internal vesicle of an outgrowth cultured in the presence of both U0126 and BIO, while no Oct4-positive cells were present in the internal vesicle of the control, indicating that the two inhibitors act in a similar synergistic fashion either in the absence or presence of serum in terms of promoting Oct4 retention (Fig. 6B). However, it is noteworthy that these Oct4-positive cells also co-express Gata6, in contrast to the exclusively Oct4-positive cells in the serum group.

## 5.5 DISCUSSION

Little is known of the initial events involved in the derivation of ES cells from rat blastocysts [13]. Here, using systematic verification of individual parameters influencing pluripotent cell survival in rat blastocyst primary outgrowths, we demonstrate for the first time the retention of pluripotent cells under conventional culture conditions used for ES derivation, in combination with MEK and GSK3 inhibitors, and the localization of these pluripotent cells within primary outgrowths. Further, we delineate the individual roles

played by these two inhibitors in early lineage decisions during the process of rat ES cell derivation.

The beneficial effect of using serum-containing medium during the initial phase of rat ES cell derivation was demonstrated, since it not only promoted a compact outgrowth morphology preferred for ES cell derivation [15], but also the retention of exclusively Oct4-positive cells, i.e pluripotent cells, within outgrowths. Indeed, under conventional culture conditions commonly used for ES cell derivation in the mouse, including culture in the combined presence of serum, MEFs and LIF, outgrowths displayed a compact morphology with multiple layers of tightly packed cells and an internal vesicle either bordered by or containing exclusively Oct4-positive cells, and very low if any PrE marker expression (Fig. 5 and 6). In contrast, serum-free medium promoted the formation of PrE at the expense of pluripotent cells, as judged by the predominance of Gata6-positive cells. This difference was accentuated in the combined presence of MEK and GSK3 inhibitors where pluripotent cells were favoured in the serum-containing group, whereas ICM and PrE marker co-expression was found in serum-free conditions. Given that rat ICMs and epiblasts have an innate propensity towards differentiation into extraembryonic lineages such as PrE when placed in culture [11, 17], and that pluripotency is rapidly lost [18], conditions that limit the appearance of the PrE lineage and promote expansion of pluripotent cells would be beneficial for rat ES cell derivation.

The results presented herein also offer insight into the localization of pluripotent cells within primary outgrowths. It was found that exclusively Oct4-positive cells were generally located in immediate proximity to the internal vesicle within outgrowths, whether in serum-containing or serum-free conditions, and whether in the presence of both inhibitors or not. To our knowledge, this is the first report documenting an association of pluripotent rat embryonic cells with the presence of an internal vesicle in outgrowths. Awareness of the localization of pluripotent cells within rat blastocyst outgrowths should provide an easily identifiable morphological indication of the presence of pluripotent cells within a given outgrowth.

The role played by the individual inhibitors on pluripotent versus PrE lineage decisions has not been examined previously. Here we show that inhibition of MEK alone under serum-free conditions not only inhibits the formation of internal vesicles, but also diminishes the presence of pluripotent cells. In addition to providing support for the positive association between Oct4-positive cells and internal vesicles, these results also suggest that in terms of culture conditions for the derivation of pluripotent rat cells, MEK inhibition alone may not be ideal [19]. Instead, MEK inhibition appeared to promote the PrE lineage in outgrowths, as demonstrated by Oct4 and Gata6 co-expression. Interestingly, no apparent effect on trophoblast giant cells in outgrowths was noted under MEK inhibition, suggesting that maintenance of this extraembryonic lineage may not rely on MEK activity, contrary to the mouse [6]. In addition, when pre-implantation rat embryos were treated with U0126 alone, developmental delay at the morula stage was noted in preliminary experiments. An

interesting experiment would be to place such delayed embryos in culture to examine their capacity to outgrow and form trophoblast giant cells, and to examine their lineage composition. This would indicate whether trophectoderm formation from the 8-cell stage is compromised or inhibited by MEK inhibition. One group recently reported that MAPK inhibition with PD98059 compromises TE function in mouse embryos and during trophoblast outgrowth in culture [6], whereas another group has noted that U0126 treatment does not interfere with embryo development to the blastocyst stage [20].

Under GSK3 inhibition alone, outgrowths cultured with serum lost Oct4 expression. Similar to the results obtained with MEK inhibition alone, GSK3 inhibition alone under serum-free conditions also promoted the PrE lineage, with reduced numbers of exclusively Oct4-positive cells. Recently, Li and colleagues reported that culture of rat blastocysts with BIO permitted Oct4 retention [21]. However, their basic medium did not support the growth of Oct4-positive cells. This difference may be due to different doses of BIO used (2  $\mu$ M vs 5  $\mu$ M in our case) or to the fact that examination of Oct4 retention in outgrowths was carried out after only 12 hours of culture, whereas we examined Oct4 retention after 96 hours of culture.

Importantly, when both GSK3 and MEK were inhibited in the presence of serum, both internal vesicle formation and the retention of pluripotent cells were favored. These conditions appear to constitute a good starting point for future attempts at derivation of pluripotent rat ES cells. A similar report recently described the combined use of MEFs, LIF and MEK and GSK3 inhibitors to maintain pluripotency of cells from rat blastocyst

outgrowths [3]. The authors noted that experiments using conventional culture conditions with MEFs and LIF, both with and without serum, resulted in loss of Oct4 within 3 days. It is not known whether conventional culture conditions combined with the two inhibitors allow retention of pluripotent cells, and whether the PrE lineage can be inhibited under these conditions. It should be noted that different MEK and GSK3 inhibitors were used, however, such that the doses and specificities could be different, and that the inhibitors were only used in the absence of serum. The reasons for improved retention of pluripotency when combining the use of the two inhibitors which, when used alone, promote PrE formation are not clear at present, but may have to do with cross-talk of GSK3 and MEK in other signaling pathways [22, 23]. For example, Sato and colleagues have noted that pluripotency of mouse ES cells might be affected by other BIO-activated signaling pathways such as those activated or repressed by growth factors and insulin, given the involvement of GSK3 in multiple pathways [9].

## 5.6 CONCLUSIONS

This report demonstrates for the first time a beneficial role of conventional culture conditions for ES derivation when combined with MEK and GSK3 inhibitors. Culture conditions are described that favor retention of exclusively Oct4-positive pluripotent cells, and inhibit the PrE lineage, often found to contaminate rat ES cultures. Further, the individual roles played by MEK and GSK3 pathways during the initial phases of rat ES cell derivation, as well as a potential role of MEK inhibition in delaying pre-implantation development were delineated. The examination of the role of these pathways in early

lineage decisions both in the rat embryo and during primary outgrowth formation offers a unique approach to deciphering molecular events involved in lineage choice in this species. Together, these results will help in the development of conditions that favor the proliferation and culture of pluripotent rat ES cells for use in gene-targeting procedures.

### **5.7 ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Marina Poulin and Normand Lacasse for assistance with animal care, and Carmen Léveillé for technical assistance. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada , by Clonagen Inc. and by the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). J.A.D. is supported by a Post-Doctoral Fellowship from the Canadian Arthritis Network and Clonagen Inc., and S.-P.D. is supported by a NSERC Industrial Postgraduate Scholarship and Clonagen Inc. The authors have no real or potential conflicts of interest to declare with entities related to the material being published.

## 5.8 REFERENCES

1. TJ Aitman, JK Critser, E Cuppen, A Dominiczak, XM Fernandez-Suarez, J Flint, D Gauguier, AM Geurts, M Gould, PC Harris, et al: **Progress and prospects in rat genetics: a community view.** *Nat Genet* 2008, **40**:516-22.
2. HJ Jacob: **Functional genomics and rat models.** *Genome Res* 1999, **9**:1013-6.
3. M Buehr, S Meek, K Blair, J Yang, J Ure, J Silva, R McLay, J Hall, QL Ying, A Smith: **Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts.** *Cell* 2008, **135**:1287-98.
4. P Li, C Tong, R Mehrian-Shai, L Jia, N Wu, Y Yan, RE Maxson, EN Schulze, H Song, CL Hsieh, et al: **Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts.** *Cell* 2008, **135**:1299-310.
5. M Maekawa, T Yamamoto, M Kohno, M Takeichi, E Nishida: **Requirement for ERK MAP kinase in mouse preimplantation development.** *Development* 2007, **134**:2751-9.
6. CW Lu, A Yabuuchi, L Chen, S Viswanathan, K Kim, GQ Daley: **Ras-MAPK signaling promotes trophectoderm formation from embryonic stem cells and mouse embryos.** *Nat Genet* 2008, **40**:921-6.
7. T Burdon, I Chambers, C Stracey, H Niwa, A Smith: **Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells.** *Cells Tissues Organs* 1999, **165**:131-43.



8. H Umehara, T Kimura, S Ohtsuka, T Nakamura, K Kitajima, M Ikawa, M Okabe, H Niwa, T Nakano: **Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase-3.** *Stem Cells* 2007, **25**:2705-11.
9. N Sato, L Meijer, L Skaltsounis, P Greengard, AH Brivanlou: **Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor.** *Nat Med* 2004, **10**:55-63.
10. QL Ying, J Wray, J Nichols, L Battle-Morera, B Doble, J Woodgett, P Cohen, A Smith: **The ground state of embryonic stem cell self-renewal.** *Nature* 2008, **453**:519-23.
11. SP Demers, JG Yoo, L Lian, J Therrien, LC Smith: **Rat Embryonic Stem-Like (ES-Like) Cells Can Contribute to Extraembryonic Tissues In Vivo.** *Cloning Stem Cells* 2007, **9**:512-22.
12. SP Demers: **Evaluation of developmental capacity reveals heterogeneity of rat embryonic stem-like (RESL) cells.** *Stem Cells* submitted.
13. SP Demers, Smith, L.C.: **Derivation, culture, and in vivo developmental capacity of embryonic cell lines from rat blastocysts.** In: *Rat genomics: gene identification, functional genomics and model applications* Edited by I Anegon. Totowa: Humana Press; (in press) 2010.
14. K Miyoshi, T Kono, K Niwa: **Stage-dependent development of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium after fertilization in vivo and in vitro.** *Biol Reprod* 1997, **56**:180-5.
15. A Nagy: **Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual**, 3rd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.

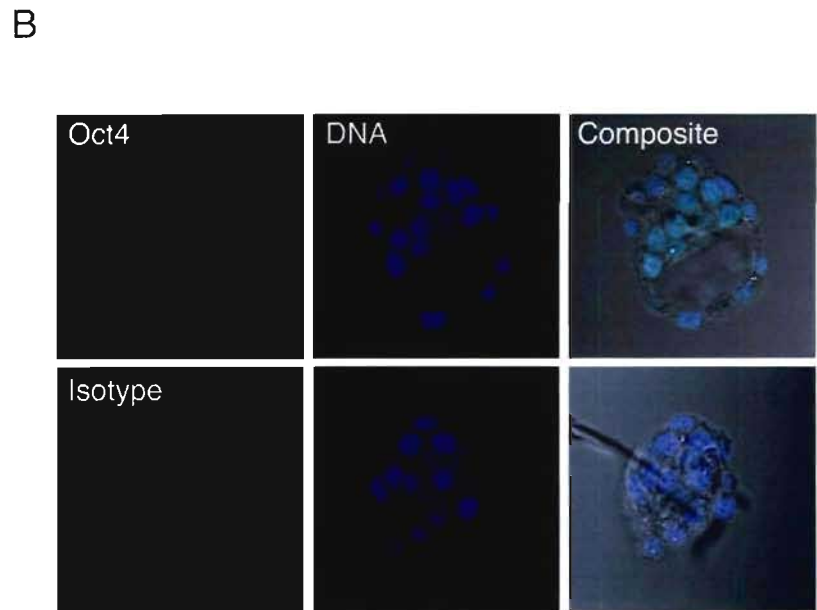
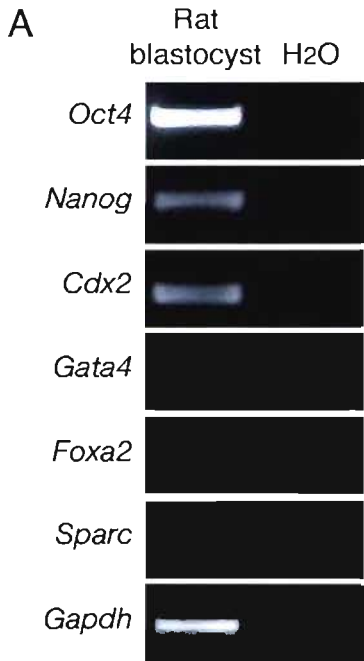
16. S Meloche: **Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44mapk and p42mapk isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition.** *J Cell Physiol* 1995, **163**:577-88.
17. J Nichols, A Smith, M Buehr: **Rat and mouse epiblasts differ in their capacity to generate extraembryonic endoderm.** *Reprod Fertil Dev* 1998, **10**:517-25.
18. M Buehr, J Nichols, F Stenhouse, P Mountford, CJ Greenhalgh, S Kantachuvesiri, G Brooker, J Mullins, AG Smith: **Rapid loss of Oct-4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines.** *Biol Reprod* 2003a, **68**:222-9.
19. M Buehr, A Smith: **Genesis of embryonic stem cells.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003b, **358**:1397-402; discussion 1402.
20. M Maekawa, T Yamamoto, T Tanoue, Y Yuasa, O Chisaka, E Nishida: **Requirement of the MAP kinase signaling pathways for mouse preimplantation development.** *Development* 2005, **132**:1773-83.
21. C Li, Y Yang, J Gu, Y Ma, Y Jin: **Derivation and transcriptional profiling analysis of pluripotent stem cell lines from rat blastocysts.** *Cell Res* 2009, **19**:173-86.
22. J Klysik, SJ Theroux, JM Sedivy, JS Moffit, K Boekelheide: **Signaling crossroads: the function of Raf kinase inhibitory protein in cancer, the central nervous system and reproduction.** *Cell Signal* 2008, **20**:1-9.
23. L Kim, AR Kimmel: **GSK3 at the edge: regulation of developmental specification and cell polarization.** *Curr Drug Targets* 2006, **7**:1411-9.

**5.9 TABLES AND FIGURES**

**Table 5.1** In vitro development of rat pre-implantation embryos in the presence of MEK inhibitor U0126 (20  $\mu$ M).

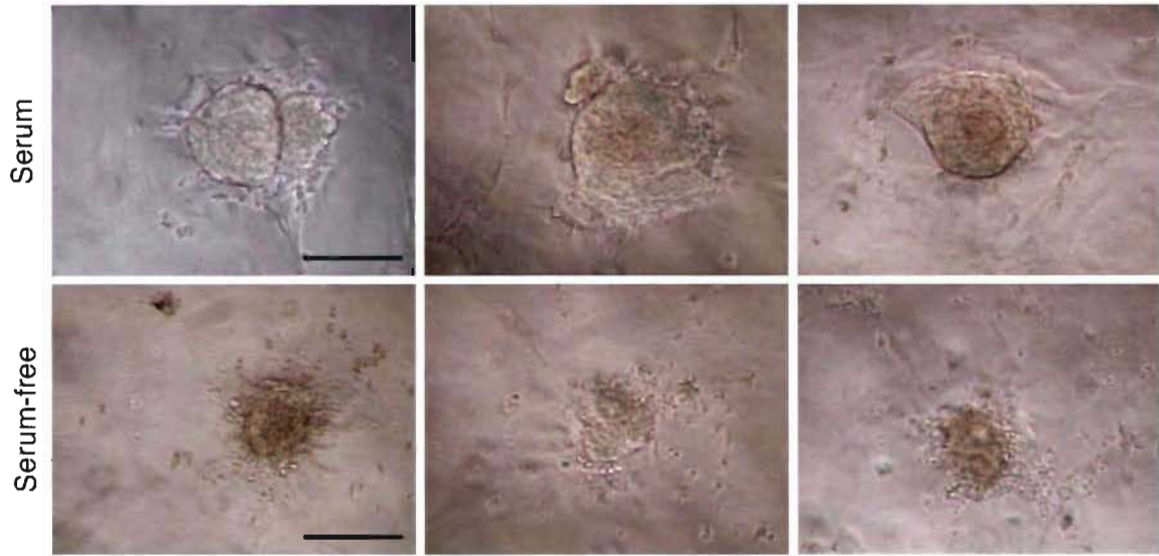
group	Time	8-cell	Morula	Blastocyst	Fragmented
DMSO	0h	6	-	-	-
DMSO	24h	-	3	2	1
DMSO	36h	-	1	3	2
U0126	0h	6	-	-	-
U0126	24h	-	4	1	1
U0126	36h	-	3	1	2

Demers, Desmarais et al. Figure 1.



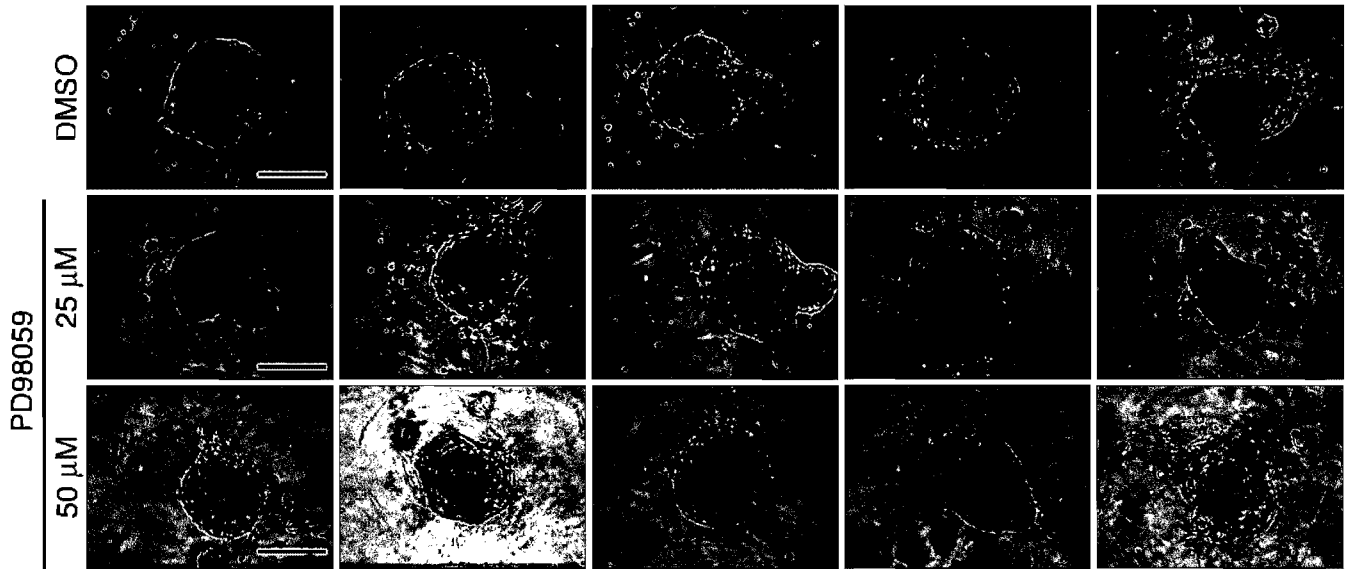
**Figure 5.1** Early lineage markers of ICM, TE, and PrE are expressed in the pre-implantation rat embryo. A) RT-PCR depicting the expression of *Oct4*, *Nanog*, *Cdx2* and *Gata4*, but not *Foxa2* and *Sparc* in 4.5 dpc rat blastocysts (left lane). *Gapdh* was used as a control housekeeping gene. B) Immunofluorescence analysis and visualization by confocal microscopy of a 4.75 dpc rat blastocyst. In the upper left panel, Oct4 expression was localized to the ICM blastocyst (green). In the bottom left panel, first antibody was replaced by the control isotype, no green signal was detected. DAPI stains DNA in blue. Composite images are represented. Magnification= 400X.

Demers, Desmarais et al. Figure 2.

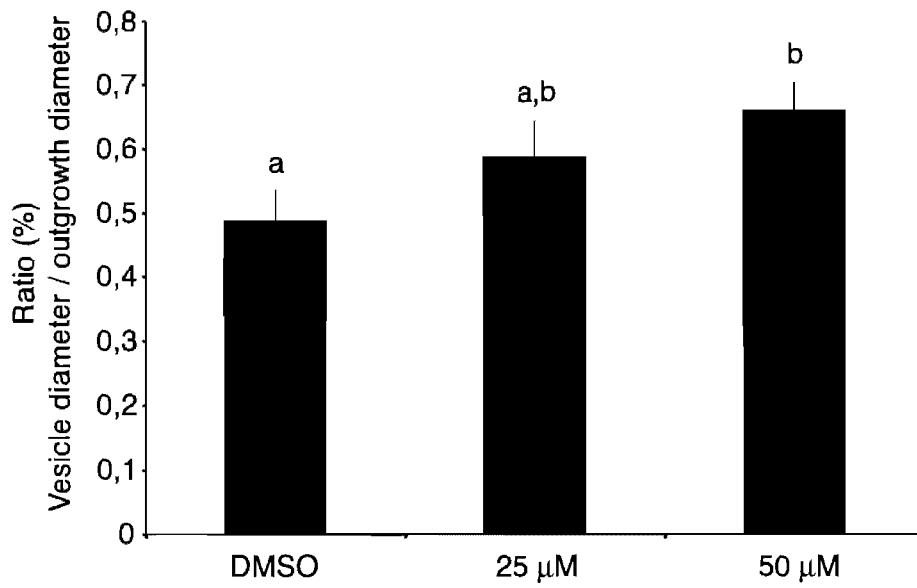


**Figure 5.2** Absence of serum engenders differences in morphology of primary outgrowths. Brightfield micrographs of outgrowths cultured in Rat ES medium in the presence or absence of serum. A compact three-dimensional dome-shaped outgrowth with an internal vesicle can be visualised in the presence of serum, while growth of tightly packed cells surrounding the internal vesicle is inhibited in the absence of serum, but not growth of cells located inside the internal vesicle. Bars= 200  $\mu\text{m}$ .

A

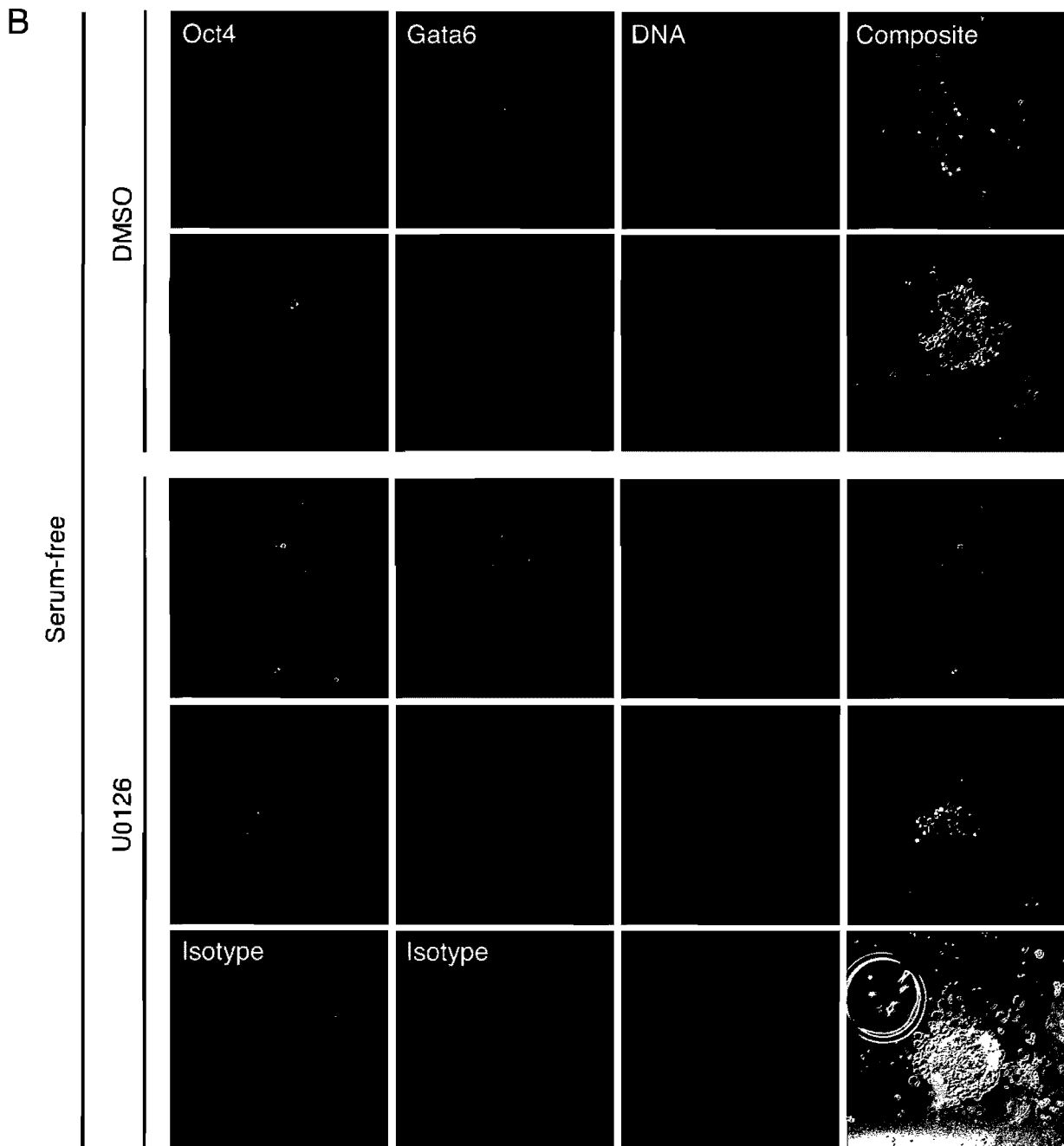
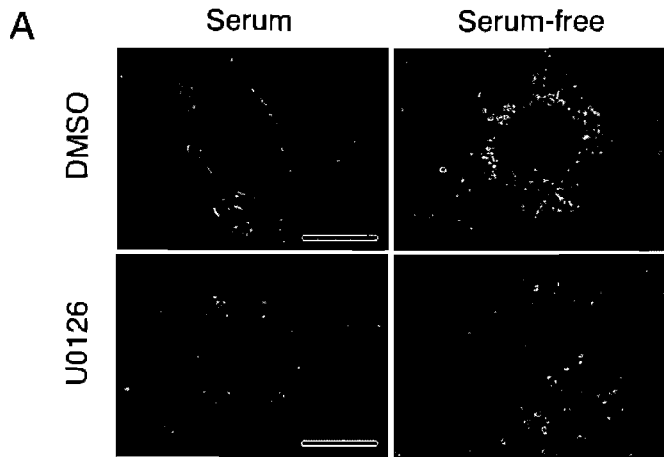


B



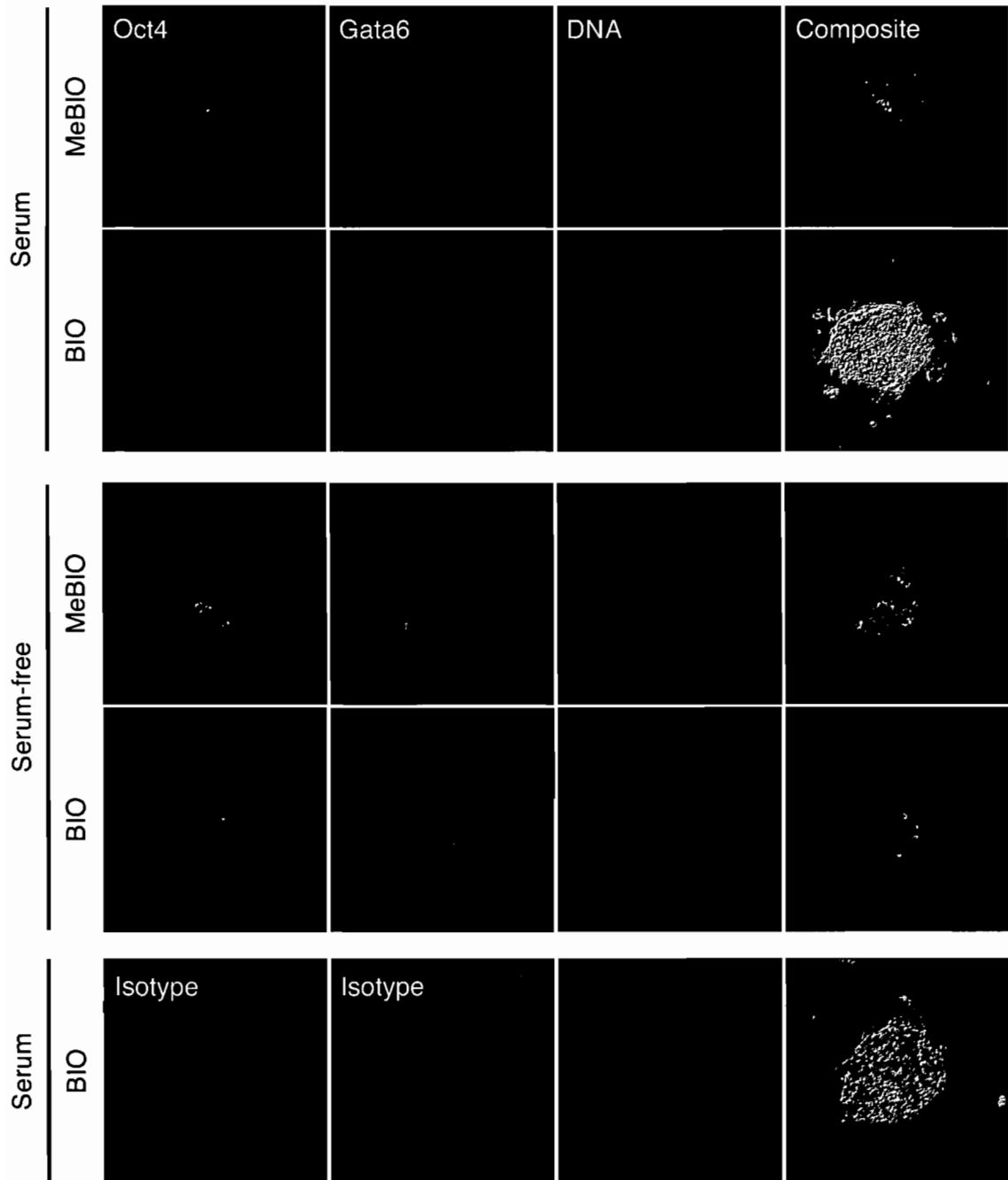


**Figure 5.3** MEK inhibitor PD98059 increases the relative size of internal vesicles within primary blastocyst outgrowths at 50  $\mu\text{M}$ . A) Brightfield micrographs of outgrowths treated with 25 or 50  $\mu\text{M}$  PD98059 or vehicle control (DMSO). A dose of 50  $\mu\text{M}$  PD98059 yields a significantly larger ratio of vesicle diameter / outgrowth diameter compared to DMSO. Bars= 200  $\mu\text{m}$ . B) Mean comparison of ratios (%) of internal vesicle diameter / outgrowth diameter ( $P>0,05$ ) for outgrowths treated with 25, 50  $\mu\text{M}$  PD98059 and control vehicle (DMSO). Different superscripts (a,b) indicate that means are significantly different.



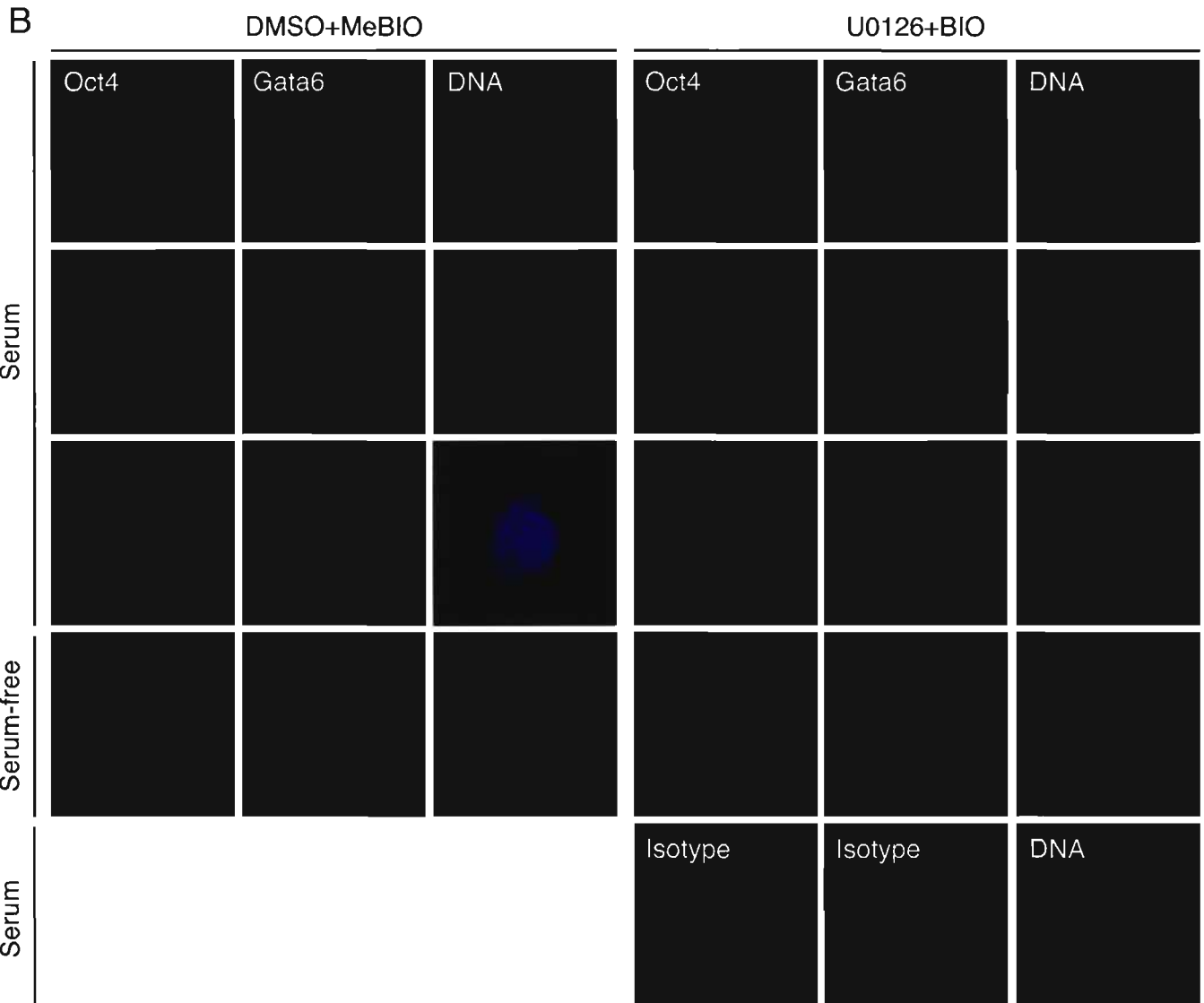
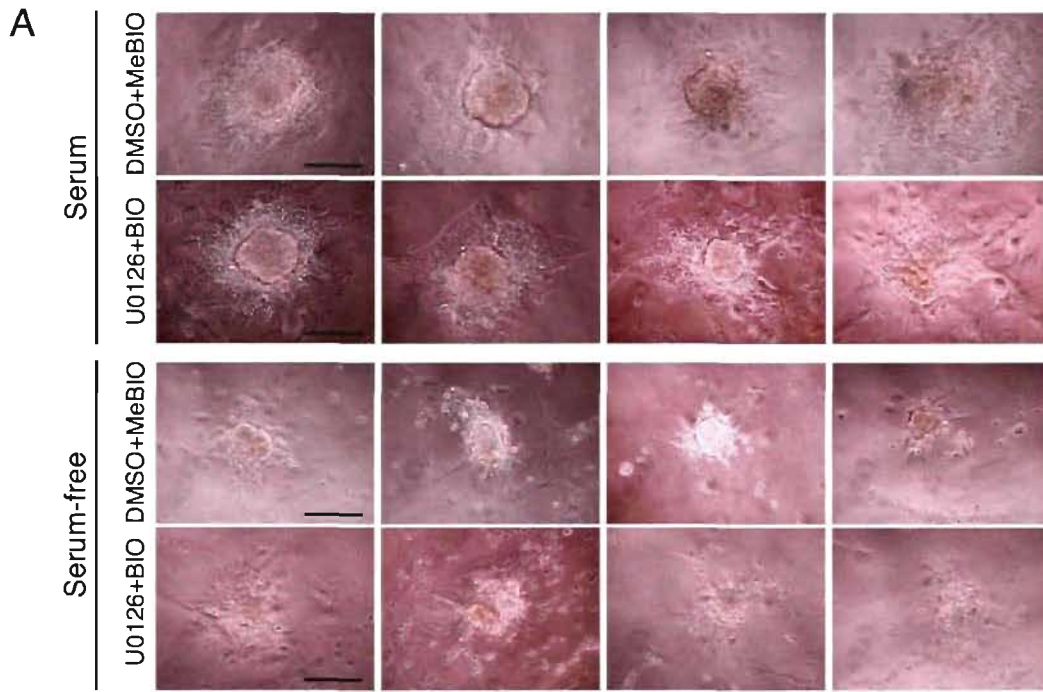
**Figure 5.4** MEK inhibitor U0126 inhibits internal vesicle formation and the presence of exclusively Oct4-positive cells in the absence of serum. A) Brightfield micrographs of outgrowths treated with 20  $\mu$ M U0126 in the presence (left column) of absence (right column) of serum. Bars= 200  $\mu$ m. B) Immunofluorescence analysis and visualization by confocal microscopy of outgrowths treated with vehicle control (left panel) or 20  $\mu$ M U0126 (right panel). Oct4 stains in green, Gata6 in red and DNA in blue. A composite image was represented for each outgrowth. Presence of exclusively Oct4-positive cells can be found in the control group, but not in the group treated with U0126 in the absence of serum. Note the presence of trophoblast giant cells in the control as well as in U0126-treated group. Magnification= 200X.

Demers, Desmarais et al. Figure 5.



**Figure 5.5** GSK3 inhibition promotes PrE formation rather than maintenance of pluripotent cells. Immunofluorescence analysis and visualization by confocal microscopy of outgrowths treated with 5  $\mu$ M MeBIO or 5  $\mu$ M BIO, in the presence or absence of serum. Oct4 stains in green, Gata6 in red and DNA in blue. A composite image was represented for each outgrowth. No evident morphological differences in the outgrowths were observed between the control and the treatment in regards to the presence of exclusively Oct4-positive cells. Gata6-positive cells were more evident in the serum-free groups than the serum-containing groups. Magnification= 200X.

Demers, Desmarais et al. Figure 6.



**Figure 5.6** U0126 and GSK3 inhibitor BIO act synergistically to maintain exclusively Oct4-positive cells in the presence of serum. A) Brightfield micrographs of the outgrowths treated with vehicle control (DMSO+MeBIO) or both inhibitors (U0126+BIO) in the presence or in the absence of serum. Bars= 200  $\mu$ m. B) Immunofluorescence analysis and visualization by confocal microscopy of outgrowths treated with vehicle control (left panel) or both inhibitors (right panel), in the presence or absence of serum. Oct4 stains in green, Gata6 in red and DNA in blue. In the U0126+BIO group, exclusively Oct4-positive cells are detected at higher frequency when compared to the control group. Magnification= 200X.

## 6.0 DISCUSSION GÉNÉRALE

Les études menées ici sur la dérivation de cellules ES chez le rat apportent de l'importance à plusieurs notions dont la valeur demeurerait peu appréciée jusqu'à maintenant. Le processus de dérivation de cellules ES est loin d'être banal et implique plusieurs étapes interdépendantes. Nos études illustrent que la dérivation de cellules ES est non seulement un procédé empirique, mais que des notions fondamentales se cachent derrière les phénotypes cellulaires observés *in vitro* et *in vivo*. Il existe donc un avantage à comprendre d'où proviennent les qualités intrinsèques de l'embryon de stade pré-implantatoire du rat qui dictent le comportement des explants *in vitro* et qui mènent à la formation de lignées cellulaires. Les questionnements sur l'identité des cellules ES, leur équivalence *in vivo*, et le maintien de l'état pluripotent *in vitro* ont non seulement des implications importantes sur la compréhension des événements se déroulant dans l'embryon, mais permettent aussi d'identifier et de saisir en quoi consiste la pluripotentialité, cette capacité de générer tous les types cellulaires. L'identification des facteurs et des conditions qui permettent le maintien de cellules ES pluripotentes *in vitro* et *in vivo* chez le rat permettra non seulement de mieux comprendre la biologie fondamentale du développement, mais surtout d'augmenter l'efficacité de contribution de cellules ES aux tissus embryonnaires et aux cellules germinales. Par le fait même, la production de modèles de rats possédant des mutations ciblées par recombinaison homologue deviendra possible.



## 6.1 La contribution in vivo des cellules RESL

Nous avons développé un système de dérivation, de culture, et de caractérisation de cellules RESL qui n'existait pas auparavant chez le rat. Ces cellules RESL ont été dérivées à partir d'embryons de rats au stade blastocyste, et leur caractérisation in vitro a été effectuée. La détection de plusieurs marqueurs connus de cellules ES chez la souris, tels que l'activité AP, SSEA-1, combinée aux critères morphologiques tels que la croissance en colonies composées de multiple couches de petites cellules possédant de gros noyaux et de petits cytoplasmes, constituaient les premières indications que des lignées semblables aux cellules ES de souris avaient été obtenues. Cultivées durant de longues périodes de temps, ces cellules RESL maintenaient à la fois un caryotype normal et l'expression de la protéine Oct4, et ont même pu être soumises à des manipulations génétiques semblables à celles effectuées sur les cellules ES murines. La manipulation génétique de cellules ES chez le rat est une étape essentielle à franchir si elles doivent servir à la production de rats dont un ou plusieurs gènes sont inactivés. Cette sorte de manipulation avait déjà été tentée, mais aucune donnée n'avait été présentée (Buehr, Nichols et al. 2003a). Nous avons trouvé que l'ARN messager ainsi que la protéine Oct4 étaient tous deux présents, ce qui n'avait pas été décrit auparavant. Par contre, notre contrôle négatif d'immunofluorescence, puisqu'il consistait en la présence du deuxième anticorps seulement, ne permettait pas d'assurer la spécificité du signal. Pour cette raison, dans les études subséquentes d'immunofluorescence, les anticorps des marqueurs pluripotents ont été testés sur une lignée ES murine (données non publiées) et les isotypes appropriés ont été utilisés. De plus,

puisque'il est préférable de faire appel à un plus grand éventail de marqueurs de l'état pluripotent, comme Nanog et Sox2 entre autres, ceci a également été effectué dans les études subséquentes.

Toutefois, la capacité de développement in vivo des cellules RESL n'était pas connue. Afin de déterminer si nos cellules RESL étaient pluripotentes, nous avons choisi d'examiner leur capacité à s'intégrer à des blastocystes et à contribuer au développement de tissus in vivo. Cette étape cruciale était fonction d'une technique de transfert embryonnaire efficace, ce que nous avons pu démontrer. Combinée à la détection des descendants des cellules RESL injectées par analyse de microsatellites, et subséquentement à l'aide de transgènes comme marqueurs intracellulaires, cette technique de transfert embryonnaire a permis la constatation que les cellules RESL peuvent soutenir et participer au développement normal du fœtus chez le rat jusqu'à l'âge adulte. Cette publication était la première à démontrer la capacité de développement in vivo de cellules isolées du blastocyste chez le rat, et par le fait même constituait une avancée importante vers l'obtention de cellules ES pluripotentes chez le rat. Nous avons par la suite élargi nos observations en utilisant cette fois des cellules RESL marquées avec un transgène. Cet outil nous a permis de mieux cerner auxquels tissus extraembryonnaires les cellules RESL avaient contribué, et a démontré le caractère multipotent des cellules RESL in vivo. En effet, ces cellules peuvent contribuer aux multiples lignages extraembryonnaires provenant d'origines distinctes. Malgré le fait que ces résultats aient confirmé et ajouté à ceux obtenus dans le contexte du premier article, il n'en demeure pas moins que les cellules RESL contribuent, de manière soutenue et

persistante, exclusivement aux tissus extraembryonnaires, et sont exclues d'une contribution aux tissus embryonnaires.

Cependant, des indices sur la capacité de différenciation *in vivo* des cellules RESL auraient pu être obtenus en effectuant des essais de tératomes. Il aurait été possible de savoir si les cellules possédaient la capacité de générer des tissus embryonnaires *in vivo*, en dehors du contexte de l'embryogénèse. En effet, dans certaines études récentes, les auteurs ont fait appel à cette méthode d'évaluation *in vivo* et ont démontré que certaines lignées de cellules RESL pouvaient générer des tératomes contenant des tissus appartenant à de multiples lignages embryonnaires (Ueda, Kawamata et al. 2008; Li, Yang et al. 2009). La capacité de contribuer à des gamètes fonctionnelles n'est toutefois pas évaluée avec cette technique. Ceci constitue un désavantage lorsque l'objectif est de générer des chimères pouvant transmettre le génome des cellules ES à la génération suivante. Un indicateur supérieur de l'état pluripotent serait d'examiner leur capacité de développement dans l'embryon *in vivo*.

Afin de mieux comprendre pourquoi les cellules RESL étaient portées à ne contribuer qu'aux tissus extraembryonnaires *in vivo*, nous avons décidé d'utiliser une approche novatrice chez le rat. Des études menées chez la souris ont démontré que l'efficacité de contribution de cellules ES aux tissus de chimères pouvait être augmentée en introduisant les cellules dans un embryon de huit cellules plutôt qu'au stade du blastocyste (Schoonjans, Kreemers et al. 2003; Huang, Deng et al. 2008). Sachant qu'il est possible de produire des blastocystes chimériques chez le rat en co-cultivant soit deux embryons au stade huit

cellules (Mayer and Fritz 1974), ou un embryon et une petite masse de cellules RESL, et que la technique d'agrégation  $4n$  était aussi utilisée fréquemment chez la souris pour augmenter le taux de chimérisme provenant de cellules ES (Nagy 2003), nous avons adapté ces méthodes pour générer des chimères embryonnaires chez le rat et avons analysé la contribution des cellules RESL à de multiples tissus *in vivo*. Les résultats ont indiqué que les cellules RESL ne sont pas exclues de l'ICM au stade blastocyste suite à des agrégations  $2n$  ou  $4n$ . Par contre la contribution a aussi été notée dans les cellules du TE à ce stade, ce qui pourrait potentiellement expliquer la contribution aux tissus du trophoblaste tel qu'observé à la migration. Une hypothèse aurait été soulevée pour expliquer un tel phénomène observé dans quelques instances chez la souris, où une contribution mineure de cellules ES au trophoblaste aurait été notée (Beddington and Robertson 1989). L'hypothèse avançait que cette contribution pourrait être due soit à la croissance ectopique des cellules ES, ou à une véritable différenciation en cellules du trophoblaste. L'autre possibilité serait que la population de cellules ES contiendrait déjà à l'origine une petite population de cellules du TE qui contaminerait en quelque sorte les cultures de cellules ES (Gardner and Brook 1997). Dans ce dernier cas on s'attendrait à pouvoir détecter des marqueurs du TE comme Cdx2 dans les cultures, ce que nous n'avons pas détecté (données non publiées). D'après les morphologies observées en immunohistochimie dans le deuxième article, il semblerait que les cellules RESL se soient véritablement différenciées en plusieurs types de cellules extraembryonnaires, y compris des types trophoblastiques. Par contre, pour en être absolument certain, il faudrait pouvoir démontrer un co-marquage du transgène avec un marqueur de cellules trophoblastiques en plus de la morphologie, et même idéalement

pouvoir démontrer que ces cellules possèdent des fonctions associées exclusivement aux cellules de ce lignage.

Quant à la croissance ectopique des cellules ES dans leur nouvel environnement, une explication serait que l'environnement du blastocyste chez le rat constitue un environnement qui module fortement le comportement et la différenciation des cellules RESL qui y sont introduites. Cet environnement restrictif dirigerait la différenciation en lignages différents du comportement *in vitro*, et ne dépendrait pas du stade de développement car aucune contribution aux tissus embryonnaires de fœtus n'a été notée soit par injection ou par agrégation. Il existe une telle situation chez la souris, où les cellules ES ne peuvent pas contribuer au lignage de l'endoderme pariétal dans des chimères, tandis qu'*in vitro* elles le peuvent (Beddington and Robertson 1989). De plus, les cellules souches de l'endoderme extraembryonnaire, les cellules XEN, sont fortement biaisées vers le lignage d'endoderme pariétal lorsqu'elles sont introduites dans des blastocystes, tandis qu'*in vitro* elles se différencient à la fois en endoderme viscéral et en endoderme pariétal (Kunath, Arnaud et al. 2005). Il se peut donc que les cellules RESL agissent ainsi comme progénitrices pluripotentes *in vitro* mais comme progénitrices multipotentes dans l'embryon. Il se pourrait aussi que l'environnement de l'embryon soit si influent que les cellules RESL se différencient très rapidement, tel qu'il a été noté lors d'essais d'injections de cellules souches neuronales dans des blastocystes murins (Greco, Low et al. 2004).

Il est possible que le test d'agrégation  $4n$  soit trop exigeant pour permettre l'obtention de chimères, car il impose aux cellules ES la formation complète de l'embryon (Jaenisch and Young 2008). Si ces cellules ne sont pas parfaitement compétentes, il se peut que le développement ne procède pas normalement. De plus, il existe une différence entre les lignées ES murines quant à leur capacité de donner lieu à des fœtus et nouveau-nés par agrégation  $4n$ , notamment certaines lignées sont utilisées avec plus de succès que d'autres (Nagy, Rossant et al. 1993). Cette propriété pourrait être attribuée au patrimoine génétique à la fois des lignées et des embryons hôtes (Li, Wei et al. 2005). Dans cette optique, il serait intéressant dans le contexte d'études futures de tester de multiples combinaisons de patrimoines génétiques lors d'essais d'agrégations embryonnaires.

Puisqu'à la fois les injections de blastocystes et les agrégations  $2n$  ont donné des contributions exclusivement extraembryonnaires, et que les cellules RESL peuvent de toute évidence se différencier assez aisément in vitro en trois feuillets germinatifs embryonnaires, nous avons conclu que les cellules RESL constituent une population hétérogène, et que des cellules moins compétentes auraient été choisies au hasard lors des expériences d'évaluation de capacité de développement in vivo. Des études menées chez la souris ont démontré que lors d'injections de cellules ES murines dans des blastocystes, il y a au plus trois cellules qui contribuent aux tissus de l'embryon chimérique (Wang and Jaenisch 2004). En général, entre 10 et 15 cellules ES sont injectées (Nagy 2003), ce qui veut dire que la grande majorité de ces cellules ne contribuent pas à l'embryon. Ceci veut aussi dire que le choix de cellules ultra-compétentes est primordial si un taux de chimérisme élevé est

souhaité. L'interprétation du caractère hétérogène des cellules RESL repose sur la constatation que les cultures indifférenciées étaient composées de sous-types différents tel que démontré par les pourcentages de cellules exprimant différents marqueurs pluripotents. Par contre, pour savoir si les sous-types possèdent véritablement de différents potentiels de différenciation *in vivo*, il faudrait d'abord identifier et isoler les sous-types séparément, de manière à ce que les cellules demeurent viables. Ceci pourrait être effectué à l'aide de gènes rapporteurs composés de promoteurs dirigeant l'expression de différentes protéines fluorescentes correspondant chacune à un marqueur pluripotent. Ensuite il serait possible de procéder aux agrégations ou injections de blastocystes, et de vérifier et comparer l'étendue de contributions des différents sous-types *in vivo*.

## **6.2 Les similitudes et les différences interspèces**

Une explication supplémentaire aux résultats de contribution *in vivo* obtenus dans le cadre de nos études serait que les cellules RESL ressembleraient aux cellules EpiSC de souris, et aux cellules ES humaines, plutôt qu'aux cellules ES murines. Plusieurs indices à cet effet ont été notés dans le deuxième article, par exemple, lorsque la différenciation des cellules RESL est effectuée *in vitro*, des cellules nerveuses, chondrogéniques et endodermiques entre autres sont obtenues, représentant les trois feuillets germinatifs. Mais comme les EpiSC, leur contribution aux tissus embryonnaires de chimères est absente. De plus, dans leur état indifférencié ainsi que lorsqu'elles sont différenciées en cellules EB, elles

expriment plusieurs marqueurs de l'épiblaste ainsi que plusieurs marqueurs de cellules pluripotentes (Brons, Smithers et al. 2007; Tesar, Chenoweth et al. 2007). De plus, elles ne requièrent pas de stimulation par LIF pour maintenir l'expression des marqueurs de l'état pluripotent, tout comme les cellules ES humaines et les EpiSC murines. Une autre étude avait aussi fait état de résultats semblables quant à l'indépendance des cellules RESL au LIF pour maintenir l'expression de l'ARN messenger d'Oct4, mais les résultats n'avaient pas été poussés plus loin (Vassilieva, Guan et al. 2000).

Tous ces indices suggèrent qu'il existe des similarités fonctionnelles entre les cellules RESL, EpiSC et ES humaines, et des différences avec les cellules ES murines. Pour la première fois, nous présentons des données expérimentales à l'effet que le retrait du LIF et des MEF augmente la proportion de cellules exprimant Nanog, au lieu de causer une différenciation comme c'est le cas avec les cellules ES de souris. Quoique ces résultats aient contribué à l'avancement des connaissances en matière de régulation de l'état pluripotent dans les cellules RESL en démontrant l'indépendance au LIF et au MEF, certaines questions demeurent sans réponse. Les cellules EpiSC requièrent la présence de l'activine et du facteur de croissance fibroblastique (FGF) pour demeurer pluripotents (Rossant 2008). Est-ce que les cellules RESL répondent à ces mêmes facteurs, ou dépendent-elles de voies de signalisation alternatives? Sachant que le LIF et les MEF ne sont pas requis, il faudrait vérifier quels facteurs de croissance le sont pour le maintien de l'état indifférencié des cellules RESL. La culture des cellules RESL est grandement facilitée sans le LIF et les MEF, car elle permet l'expansion rapide de grands nombres de



cellules. Ce système de culture serait idéal pour identifier les facteurs individuels régissant leur maintien indifférencié, en commençant par l'interrogation du rôle joué par le FBS. En utilisant un milieu défini sans FBS, il serait plus facile d'identifier de manière systématique les facteurs favorisant le maintien et l'expansion de grandes proportions de cellules pluripotentes (Smith 2001). Ensuite en utilisant des bloqueurs des voies de signalisations soupçonnées comme étant possiblement impliquées dans la pluripotentialité chez le rat, il serait possible de vérifier les effets qu'aurait l'inhibition de ces voies sur les marqueurs exprimés et la capacité de différenciation des cellules *in vitro* et *in vivo*. Comme exemple de facteurs potentiellement impliqués, une étude a conclu, suite à des analyses avec micropuces, que les cellules de type ES chez le rat pourraient répondre à une stimulation par le FGF et par l'activine comme les ES humaines (Li, Yang et al. 2009).

Les cellules RESL que nous avons dérivées ont une morphologie particulière. Elles prolifèrent en agrégats composés de multiples couches de cellules poussant aux alentours d'une masse centrale de matrice extracellulaire. En plus de son caractère hétérogène, cette morphologie favorise les interactions intercellulaires et procure un microenvironnement favorable au maintien du phénotype stable observé *in vitro* sur de longues périodes consécutives de culture. Chez l'humain la croissance de cellules EC et ES à haute densité cellulaire, semblable aux agrégats de cellules RESL, permet d'empêcher la différenciation et de maintenir des lignées stables a long terme (Andrews 2002).

Nous avons noté que la majorité des cellules RESL possédaient un caryotype normal. Néanmoins il est possible que les cellules sélectionnées durant les évaluations *in vivo* ne fussent pas toutes normales en termes de nombre et structure des chromosomes. Quelques lignées de cellules EC murines, qui ont des anomalies caryotypiques, peuvent tout de même contribuer à plusieurs types cellulaires après injection dans des blastocystes, mais la plupart de ces lignées possèdent un potentiel de différenciation limité et contribuent rarement aux tissus de l'embryon (Fujii and Martin 1983; Yu and Thomson 2008). Il serait intéressant de voir si ces cellules EC, ou des cellules ES possédant des anomalies caryotypiques, démontrent vraiment une contribution préférentielle vers les tissus extraembryonnaires.

### **6.3 Les particularités de l'embryologie chez le rat**

Les connaissances actuelles en matière d'embryologie chez le rat sont relativement limitées. Seules quelques études se sont concentrées sur la caractérisation des tissus pluripotents retrouvés dans l'embryon de cette espèce (Enders, Given et al. 1978; Nichols, Smith et al. 1998; Knezevic, Poljak et al. 2005; Li, Yang et al. 2009). Étant donné que les tissus pluripotents sont à la source des cellules ES, il y aurait avantage à mieux comprendre les caractéristiques qui définissent ces tissus, ainsi que les mécanismes potentiels de différenciation en lignages tôt durant le développement. Dans cette optique, les résultats que nous présentons dans le troisième article cadrent bien dans l'objectif global des études présentées. Des différences entre le rat et la souris dans le maintien du lignage du

trophoblaste ont été notés dans cette étude lors de traitements d'embryons lors du développement in vitro. Un fait intéressant est que de telles différences interspécifiques ont déjà été notées par une autre équipe qui avait comparé les capacités de l'épiblaste isolé de souris et de rats à se différencier en endoderme extraembryonnaire in vitro (Nichols, Smith et al. 1998). Les épiblastes de rat en culture in vitro possèdent la capacité de constamment générer de l'endoderme extraembryonnaire spontanément, tandis que les épiblastes de souris ont perdu cette capacité au stade équivalent de développement (Nichols, Smith et al. 1998). D'après nos résultats et ceux présentés par d'autres groupes (Buehr, Nichols et al. 2003a; Li, Yang et al. 2009), il semble clair que l'ICM chez le rat a lui aussi une tendance intrinsèque à se différencier spontanément en cellules de l'endoderme extraembryonnaire, comme le démontre la morphologie et les marqueurs.

Nous avons aussi observé une co-expression de marqueurs de lignages pluripotents et du PrE dans les explants de blastocystes. Il a déjà été noté que sous les mêmes conditions expérimentales, la prolifération de l'ICM isolé du rat, une fois explanté en culture, était inhibée avant son implantation in vitro, tandis que chez la souris, la prolifération de l'ICM était stimulée avant et après son implantation, procurant ainsi un autre exemple de différences entre ces deux espèces (Spielmann, Jacob-Muller et al. 1980).

Des différences évidentes dans le potentiel de développement in vivo ont également été notées chez le rat, ainsi l'épiblaste isolé et transplanté à des sites ectopiques ne donnait pas de tératocarcinome comme chez la souris, mais plutôt un carcinome du sac vitellin

(Knezevic, Poljak et al. 2005). Une autre particularité du rat a été bien illustrée lors d'études sur le sac vitellin chez le rat, durant lesquelles le retrait chirurgical du fœtus donnait lieu à la formation de tératomes (Sobis, Verstuyf et al. 1993). Il existerait donc possiblement des différences dans la restriction des lignages embryonnaires tôt dans le développement chez le rat. Il est probable que de telles différences *in vivo* entre les espèces puissent se refléter dans le comportement de tissus explantés *in vitro*. En effet, chez l'humain les cellules ES génèrent spontanément du trophoblaste, tandis que ce n'est pas le cas pour la souris (Rossant 2008). De plus, les cellules ES humaines peuvent également se différencier en endoderme extraembryonnaire *in vitro*, tout comme les cellules EpiSC murines traitées avec le facteur de croissance protéine de morphogénèse osseuse 4 (BMP4) (Brons, Smithers et al. 2007; Rossant 2008). Une autre illustration de différences interspécifiques est celle chez la souris, où les cellules EC et ES ne peuvent normalement se différencier en trophoblaste, tandis qu'à la fois les EC et ES humaines le peuvent (Andrews 2002). Les cellules RESL ressembleraient aux cellules ES humaines à cet égard, en maintenant la capacité de se différencier en ces deux lignages extraembryonnaires.

Nous démontrons que l'embryon du rat au stade blastocyste à 4.5 dpc n'exprime pas encore de marqueurs associés à l'endoderme viscéral et pariétal, comme la souris au stade équivalent de développement (Nagy 2003). Ceci laisse croire que l'expression dans nos lignées RESL de certains de ces marqueurs tels que Forkhead box A2 (Foxa2) et la protéine sécrétée acide riche en cystéine (Sparc) indique une sorte de continuation du développement du PrE en ses deux sous-types *in vitro*. Ceci semble indiquer que les

cultures de cellules RESL imitent en quelque sorte le développement embryonnaire se déroulant *in vivo*. De plus, les cellules RESL peuvent se différencier dans les trois feuillets germinatifs. En ce sens, les cellules RESL constituent un nouveau modèle *in vitro* de différenciation de l'épiblaste du rat.

En développant des traitements *in vitro* pour limiter la formation de tissus extraembryonnaires lors de la dérivation de cellule ES chez le rat, il est fort probable que leur pluripotentialité en soit augmentée. C'est pourquoi les résultats du troisième article sont prometteurs, puisque le traitement avec deux inhibiteurs simultanément favorise le maintien de cellules pluripotentes et a pour effet de limiter l'apparition du PrE. Avec des conditions semblables mais dans l'absence de FBS, deux groupes ont tout récemment démontré qu'il était possible de dériver des lignées de cellules ES chez le rat (Buehr, Meek et al. 2008; Li, Tong et al. 2008). Ces lignées sont réputées posséder la capacité de contribuer aux cellules germinales. Il reste cependant à voir si ces lignées peuvent maintenir l'état pluripotent sur de longues périodes de culture, et surtout, si elles peuvent être soumises aux manipulations génétiques comme la recombinaison homologue tout en préservant la capacité de former des gamètes viables. Néanmoins, ces résultats sont encourageants pour le domaine et démontrent, comme les nôtres, qu'il est nécessaire de prévenir ou de bloquer la différenciation de l'ICM du rat en culture afin de maintenir des lignées ayant des capacités pluripotentes. Nos résultats examinant le rôle individuel et combiné d'inhibiteurs de MEK et GSK3 dans les explants primaires de blastocystes et le rôle de MEK durant l'embryogénèse chez le rat apportent une compréhension

supplémentaire à celle qui existe dans la littérature. Il sera possible d'appliquer ces connaissances au maintien de cellules pluripotentes capables de contribuer de manière efficace et reproductible aux cellules germinales, en plus de permettre une compréhension plus complète des mécanismes impliqués dans le destin cellulaire.

#### **6.4 Directions futures**

En vue de mieux comprendre la régulation de l'état pluripotent des cellules RESL, il serait intéressant de tester le potentiel de différenciation *in vivo* après l'étape de différenciation *in vitro* en cellules EB, puisque la sous-population de cellules marquées positives pour Nanog (possiblement la même population qui représente l'épiblaste) s'est vue augmentée. Idéalement, avant de procéder à l'évaluation *in vivo* il faudrait sélectionner seulement les cellules exprimant le plus fortement les marqueurs de pluripotentialité. Cette approche pourrait mener à des pistes intéressantes, car il a été démontré chez la souris que sous certaines conditions de culture spécifiques, le potentiel de différenciation de cellules isolées du blastocyste pouvait être augmenté par un simple ajout de facteurs de croissance sur une courte durée de temps (Chou, Chen et al. 2008). Une autre approche serait de dériver des nouvelles lignées *de novo* à partir de blastocystes, mais en utilisant les mêmes conditions de culture que celles utilisées pour les cellules ES humaines. En comparant les caractéristiques de ces cellules avec les cellules ES humaines, il serait possible de déterminer si les cellules d'ICM de rat requièrent les mêmes facteurs que l'humain pour la dérivation directement à partir de l'ICM.

Une autre expérience avec des applications pratiques intéressantes serait de tenter d'empêcher la formation des lignages extraembryonnaires directement dans l'embryon à l'aide soit de traitements avec inhibiteurs biochimiques combinés de voies de signalisation comme présenté dans les expériences du troisième article, ou bien à l'aide d'interférence à ARN dirigée par vecteurs lentiviraux ciblant les facteurs de transcription Cdx2 et Gata6 pour en diminuer l'expression.

Chez la souris, l'inhibition de la voie MAPK dans les embryons empêche l'émergence du PrE, et résulte en un développement de l'ICM entièrement en cellules d'épiblaste (Chazaud, Yamanaka et al. 2006; Silva and Smith 2008). Pour vérifier l'effet de traitements avec les inhibiteurs de MEK et GSK3 combinés sur les embryons du rat, dans un premier temps le développement in vitro pourrait être observé et les embryons analysés pour l'expression des marqueurs des trois lignages du blastocyste, si des blastocystes se sont effectivement développés. Ces embryons pourraient être utilisés pour la dérivation de nouvelles lignées. Pour vérifier si l'effet de traitements aux inhibiteurs est compensé ou annulé de manière extrinsèque versus intrinsèque, des agrégations d'embryons de type sauvage avec des embryons transgéniques traités aux inhibiteurs pourraient être effectués, et la distribution des cellules transgéniques tracée dans les blastocystes résultants. Une contribution préférentielle à l'ICM de cellules provenant de l'un ou l'autre des embryons nous informerait sur les mécanismes possiblement impliqués dans la ségrégation des lignages du blastocyste chez le rat. Chez la souris, lorsque l'expression de Gata6 est éliminée dans des

embryons, toutes les cellules des embryons traités maintiennent l'expression de Nanog (Chazaud, Yamanaka et al. 2006). Advenant un résultat semblable chez le rat, ces embryons pourraient ensuite être utilisés pour dériver des lignées de cellules ES, diminuant de la sorte la formation du PrE et du trophoblaste, et favorisant la survie et le maintien de cellules exclusivement pluripotentes.

## **7.0 CONCLUSIONS GÉNÉRALES**

### **7.1 La dérivation de cellules RESL et leur contribution in vivo**

Lors de cette première étude, nous avons démontré la dérivation efficace de cellules RESL. Ces cellules possèdent plusieurs caractéristiques de cellules ES tels qu'un caryotype normal et l'expression de marqueurs de cellules pluripotentes comme AP, SSEA-1, et le facteur de transcription Oct4, autant au niveau de l'ARN messager que de la protéine. Suite à de multiples manipulations in vitro comme la culture à long terme, la modification génétique et la cryopréservation, le phénotype demeure constant et surtout l'expression de la protéine Oc4 n'est pas affectée. De manière plus importante, lorsque ces cellules sont injectées dans des blastocystes afin de tester leur capacité de développement, elles peuvent contribuer aux tissus extraembryonnaires de fœtus à la migestation et à terme. Ces résultats démontrent pour la première fois que des cellules RESL peuvent contribuer à des tissus en développement, et représente une avancée importante vers l'obtention de cellules ES pluripotentes chez le rat.



## **7.2 L'évaluation de la capacité de développement des cellules RESL révèle leur hétérogénéité**

Lors de cette deuxième étude, nous avons fait appel à l'utilisation de plusieurs méthodes pour évaluer la capacité de développement de cellules RESL. D'abord, pour évaluer le rôle joué par le stade de développement de l'embryon hôte et pour tester la capacité des cellules RESL à contribuer aux tissus lors du développement embryonnaire, des injections de blastocystes ainsi que des agrégations embryonnaires 2n et 4n ont été utilisées. Les résultats obtenus ont démontré que les cellules RESL possèdent une capacité multipotente *in vivo* car elles peuvent contribuer à plusieurs lignages extraembryonnaires. Ensuite, les cellules RESL ont été différenciées *in vitro* vers les trois feuillets germinatifs embryonnaires, démontrant leur pluripotentialité *in vitro*. Suite à l'analyse quantitative de marqueurs de l'état pluripotent dans les populations de cellules RESL indifférenciées et différenciées, des sous-populations de cellules RESL ont été identifiées, démontrant ainsi leur caractère hétérogène. Finalement des similitudes avec les cellules ES humaines et les cellules EpiSC murines au niveau fonctionnel et au niveau d'expression de marqueurs ont été démontrées. Ces résultats ouvrent la porte à un examen systématique des facteurs et conditions de culture requis pour le maintien de l'état pluripotent et la culture de populations homogènes de cellules RESL pluripotentes capables de contribuer aux cellules germinales.

### **7.3 Le traitement d'embryons et d'explants de blastocystes avec des inhibiteurs de MEK et GSK3 maintient la pluripotentialité et perturbe le développement pré-implantatoire chez le rat**

L'analyse des marqueurs des trois lignages du blastocyste chez le rat a démontré lors de cette troisième étude que la différenciation du PrE en ses deux sous-types n'est pas encore amorcée à ce stade. Le traitement d'embryons avec un inhibiteur de MEK retarde le développement embryonnaire en empêchant la formation de blastocystes. L'avantage de l'utilisation de FBS en combinaison avec l'utilisation combinée d'inhibiteurs de MEK et GSK3 a été démontré grâce au maintien de cellules pluripotentes et à l'inhibition de formation de PrE dans des explants primaires de blastocystes de rats. De plus, la localisation de cellules pluripotentes dans ces explants a été démontrée pour la première fois. Dans l'ensemble, ces résultats définissent pour la première fois les conditions de culture requises pour maintenir des populations de cellules pluripotentes à partir d'embryons chez le rat. Ces informations serviront à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les décisions de destin cellulaire à la fois dans l'embryon du rat et lors de dérivation de cellules ES pluripotentes pouvant contribuer aux cellules germinales.

## 8.0 BIBLIOGRAPHIE

Aitman, T. J., J. K. Critser, et al. (2008). "Progress and prospects in rat genetics: a community view." Nat Genet 40(5): 516-22.

Aitman, T. J., R. Dong, et al. (2006). "Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans." Nature 439(7078): 851-5.

Andrews, P. W. (2002). "From teratocarcinomas to embryonic stem cells." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 357(1420): 405-17.

Anneren, C. (2008). "Tyrosine kinase signalling in embryonic stem cells." Clin Sci (Lond) 115(2): 43-55.

Artzt, K., P. Dubois, et al. (1973). "Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture." Proc Natl Acad Sci U S A 70(10): 2988-92.

Atkin, N. B., M. C. Baker, et al. (1974). "Chromosome studies on 14 near-diploid carcinomas of the ovary." European Journal of Cancer 10(3): 144-6.

Avilion, A. A., S. K. Nicolis, et al. (2003). "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." Genes and Development 17(1): 126-40.

Beck, F., T. Erler, et al. (1995). "Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes." Developmental Dynamics 204(3): 219-27.

Beck, S., J. A. Le Good, et al. (2002). "Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation." Nat Cell Biol 4(12): 981-5.

Beddington, R. S. and E. J. Robertson (1989). "An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo." Development 105(4): 733-7.

Beddington, R. S. and E. J. Robertson (1999). "Axis development and early asymmetry in mammals." Cell 96(2): 195-209.

Behmoaras, J., G. Bhangal, et al. (2008). "Jund is a determinant of macrophage activation and is associated with glomerulonephritis susceptibility." Nat Genet 40(5): 553-9.

Benham, F. J., P. W. Andrews, et al. (1981). "Alkaline phosphatase isozymes as possible markers of differentiation in human testicular teratocarcinoma cell lines." Dev Biol 88(2): 279-87.

Berstine, E. G., M. L. Hooper, et al. (1973). "Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma." Proc Natl Acad Sci U S A 70(12): 3899-903.

Bielinska, M., N. Narita, et al. (1999). "Distinct roles for visceral endoderm during embryonic mouse development." Int J Dev Biol 43(3): 183-205.

- Bockamp, E., M. Maringer, et al. (2002). "Of mice and models: improved animal models for biomedical research." Physiol Genomics 11(3): 115-32.
- Boiani, M. and H. R. Scholer (2005). "Developmental cell biology: Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells." Nat Rev Mol Cell Biol 6(11): 872-81.
- Boyer, L. A., T. I. Lee, et al. (2005). "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells." Cell 122(6): 947-56.
- Bradley, A. (1987). Production and analysis of chimeric mice. Oxford, IRL Press.
- Bradley, A., M. Evans, et al. (1984). "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines." Nature 309(5965): 255-6.
- Brenin, D., J. Look, et al. (1997). "Rat embryonic stem cells: a progress report." Transplant Proc 29(3): 1761-5.
- Brinster, R. L. (1974). "The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development." Journal of Experimental Medicine 140(4): 1049-56.
- Brivanlou, A. H., F. H. Gage, et al. (2003). "Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells." Science 300(5621): 913-6.
- Brons, I. G., L. E. Smithers, et al. (2007). "Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos." Nature 448(7150): 191-5.

- Brook, F. A. and R. L. Gardner (1997). "The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A 94(11): 5709-12.
- Buehr, M., S. Meek, et al. (2008). "Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts." Cell 135(7): 1287-98.
- Buehr, M., J. Nichols, et al. (2003a). "Rapid loss of Oct-4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines." Biol Reprod 68(1): 222-9.
- Burdon, T., A. Smith, et al. (2002). "Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells." Trends in Cell Biology 12(9): 432-8.
- Burdon, T., C. Stracey, et al. (1999). "Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells." Dev Biol 210(1): 30-43.
- Chambers, I. (2004). "The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells." Cloning and Stem Cells 6(4): 386-91.
- Chambers, I., D. Colby, et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell 113(5): 643-55.
- Chambers, I. and A. Smith (2004). "Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells." Oncogene 23(43): 7150-60.
- Chawengsaksophak, K., R. James, et al. (1997). "Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice." Nature 386(6620): 84-7.

Chazaud, C., Y. Yamanaka, et al. (2006). "Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway." Dev Cell 10(5): 615-24.

Chew, J. L., Y. H. Loh, et al. (2005). "Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells." Molecular and Cellular Biology 25(14): 6031-46.

Chou, Y. F., H. H. Chen, et al. (2008). "The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells." Cell 135(3): 449-61.

Cohen-Tannoudji, M. and C. Babinet (1998). "Beyond 'knock-out' mice: new perspectives for the programmed modification of the mammalian genome." Molecular Human Reproduction 4(10): 929-38.

Damjanov, I. and P. W. Andrews (2007). "The terminology of teratocarcinomas and teratomas." Nat Biotechnol 25(11): 1212; discussion 1212.

Dann, C. T. (2007). "New technology for an old favorite: lentiviral transgenesis and RNAi in rats." Transgenic Res 16(5): 571-80.

Dard, N., M. Breuer, et al. (2008). "Morphogenesis of the mammalian blastocyst." Molecular and Cellular Endocrinology 282(1-2): 70-7.

Dickson, A. D. (1979). "The disappearance of the decidua capsularis and Reichert's membrane in the mouse." Journal of Anatomy 129(Pt 3): 571-7.

- Diwan, S. B. and L. C. Stevens (1976). "Development of teratomas from the ectoderm of mouse egg cylinders." Journal of the National Cancer Institute 57(4): 937-42.
- Doetschman, T. C., H. Eistetter, et al. (1985). "The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium." Journal of Embryology and Experimental Morphology 87: 27-45.
- Dozortsev, D., T. Wakaiama, et al. (1998). "Intracytoplasmic sperm injection in the rat." Zygote 6(2): 143-7.
- Eggan, K. (2007). "Short-circuiting epiblast development." Cell Stem Cell 1(2): 131-2.
- Enders, A. C., R. L. Given, et al. (1978). "Differentiation and migration of endoderm in the rat and mouse at implantation." Anatomical Record 190(1): 65-77.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature 292(5819): 154-6.
- Fandrich, F., X. Lin, et al. (2002). "Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning." Nat Med 8(2): 171-8.
- Fong, H., K. A. Hohenstein, et al. (2008). "Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells." Stem Cells 26(8): 1931-8.



Fujii, J. T. and G. R. Martin (1983). "Developmental potential of teratocarcinoma stem cells in utero following aggregation with cleavage-stage mouse embryos." Journal of Embryology and Experimental Morphology 74: 79-96.

Gachelin, G., R. Kemler, et al. (1977). "PCC4, a new cell surface antigen common to multipotential embryonal carcinoma cells, spermatozoa, and mouse early embryos." Dev Biol 57(1): 199-209.

Gardner, R. L. (1985). "Clonal analysis of early mammalian development." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 312(1153): 163-78.

Gardner, R. L. and F. A. Brook (1997). "Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells." Int J Dev Biol 41(2): 235-43.

Gardner, R. L. and J. Rossant (1979). "Investigation of the fate of 4-5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection." Journal of Embryology and Experimental Morphology 52: 141-52.

Gill, T. J., 3rd, G. J. Smith, et al. (1989). "The rat as an experimental animal." Science 245(4915): 269-76.

Graham, V., J. Khudyakov, et al. (2003). "SOX2 functions to maintain neural progenitor identity." Neuron 39(5): 749-65.

Greco, B., H. P. Low, et al. (2004). "Differentiation prevents assessment of neural stem cell pluripotency after blastocyst injection." Stem Cells 22(4): 600-8.

- Gu, H., Y. R. Zou, et al. (1993). "Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting." Cell 73(6): 1155-64.
- Guengerich, F. P. and T. Shimada (1991). "Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes." Chemical Research in Toxicology 4(4): 391-407.
- Haegel, H., L. Larue, et al. (1995). "Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation." Development 121(11): 3529-37.
- Hamazaki, T., S. M. Kehoe, et al. (2006). "The Grb2/Mek pathway represses Nanog in murine embryonic stem cells." Molecular and Cellular Biology 26(20): 7539-49.
- Hammer, R. E., S. D. Maika, et al. (1990). "Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders." Cell 63(5): 1099-112.
- Hao, J., T. G. Li, et al. (2006). "WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells." Dev Biol 290(1): 81-91.
- Hayes, E., S. Galea, et al. (2001). "Nuclear transfer of adult and genetically modified fetal cells of the rat." Physiol Genomics 5(4): 193-204.
- Hecht, A. and R. Kemler (2000). "Curbing the nuclear activities of beta-catenin. Control over Wnt target gene expression." EMBO Rep 1(1): 24-8.

Hirabayashi, M., M. Kato, et al. (2005). "Factors affecting production of transgenic rats by ICSI-mediated DNA transfer: effects of sonication and freeze-thawing of spermatozoa, rat strains for sperm and oocyte donors, and different constructs of exogenous DNA." Mol Reprod Dev 70(4): 422-8.

Hogan, B. (1994). Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual. Plainview, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hough, S. R., I. Clements, et al. (2006). "Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of OCT4 and Nanog." Stem Cells 24(6): 1467-75.

Huang, J., K. Deng, et al. (2008). "Efficient production of mice from embryonic stem cells injected into four- or eight-cell embryos by piezo micromanipulation." Stem Cells 26(7): 1883-90.

Huelsken, J., R. Vogel, et al. (2000). "Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice." Journal of Cell Biology 148(3): 567-78.

Hyslop, L., M. Stojkovic, et al. (2005). "Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages." Stem Cells 23(8): 1035-43.

Iannaccone, P. M., G. U. Taborn, et al. (1994). "Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras." Dev Biol 163(1): 288-92.

- Jacob, H. J. (1999). "Functional genomics and rat models." Genome Res 9(11): 1013-6.
- Jaenisch, R. and R. Young (2008). "Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming." Cell 132(4): 567-82.
- Johnson, M. H. and C. A. Ziomek (1981). "The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula." Cell 24(1): 71-80.
- Kahan, B. W. and B. Ephrussi (1970). "Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma." Journal of the National Cancer Institute 44(5): 1015-36.
- Kato, M., A. Ishikawa, et al. (2004). "Production of transgenic rats by ooplasmic injection of spermatogenic cells exposed to exogenous DNA: a preliminary study." Mol Reprod Dev 69(2): 153-8.
- Keefer, C. L., D. Pant, et al. (2007). "Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates." Anim Reprod Sci 98(1-2): 147-68.
- Keller, G. (2005). "Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine." Genes and Development 19(10): 1129-55.
- Keller, G. M. (1995). "In vitro differentiation of embryonic stem cells." Current Opinion in Cell Biology 7(6): 862-9.
- Kleinsmith, L. J. and G. B. Pierce, Jr. (1964). "Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells." Cancer Res 24: 1544-51.

- Knezevic, V., M. Poljak, et al. (2005). "Yolk sac carcinoma derived from the rat epiblast as a renal isograft." Coll Antropol 29(1): 189-97.
- Koutsourakis, M., A. Langeveld, et al. (1999). "The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development." Development 126(9): 723-32.
- Kuhn, R. and F. Schwenk (1997). "Advances in gene targeting methods." Current Opinion in Immunology 9(2): 183-8.
- Kunath, T., D. Arnaud, et al. (2005). "Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts." Development 132(7): 1649-61.
- Kunath, T., M. K. Saba-El-Leil, et al. (2007). "FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment." Development 134(16): 2895-902.
- Li, C., Y. Yang, et al. (2009). "Derivation and transcriptional profiling analysis of pluripotent stem cell lines from rat blastocysts." Cell Res 19(2): 173-86.
- Li, P., C. Tong, et al. (2008). "Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts." Cell 135(7): 1299-310.
- Li, X., W. Wei, et al. (2005). "The genetic heterozygosity and fitness of tetraploid embryos and embryonic stem cells are crucial parameters influencing survival of mice derived from embryonic stem cells by tetraploid embryo aggregation." Reproduction 130(1): 53-9.

Liu, P., M. Wakamiya, et al. (1999). "Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation." Nat Genet 22(4): 361-5.

Lloyd, J. B., D. A. Beckman, et al. (1998). "Nutritional role of the visceral yolk sac in organogenesis-stage rat embryos." Reproductive Toxicology 12(2): 193-5.

Lovell-Badge, R. (2007). "Many ways to pluripotency." Nat Biotechnol 25(10): 1114-6.

MacGregor, G. R., B. P. Zambrowicz, et al. (1995). "Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells." Development 121(5): 1487-96.

Martin, G. R. (1980). "Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis." Science 209(4458): 768-76.

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(12): 7634-8.

Martin, G. R. and M. J. Evans (1974). "The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture." Cell 2(3): 163-72.

Martin, G. R. and M. J. Evans (1975). "Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 72(4): 1441-5.

Martin, G. R., L. M. Wiley, et al. (1977). "The development of cystic embryoid bodies in vitro from clonal teratocarcinoma stem cells." Dev Biol 61(2): 230-44.

Mayer, J. F., Jr. and H. I. Fritz (1974). "The culture of preimplantation rat embryos and the production of allophenic rats." J Reprod Fertil 39(1): 1-9.

Mitsui, K., Y. Tokuzawa, et al. (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." Cell 113(5): 631-42.

Molkentin, J. D., Q. Lin, et al. (1997). "Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis." Genes and Development 11(8): 1061-72.

Monti, J., J. Fischer, et al. (2008). "Soluble epoxide hydrolase is a susceptibility factor for heart failure in a rat model of human disease." Nat Genet 40(5): 529-37.

Morrissey, E. E., Z. Tang, et al. (1998). "GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo." Genes and Development 12(22): 3579-90.

Nagy, A. (2003). Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Nagy, A., E. Gocza, et al. (1990). "Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse." Development 110(3): 815-21.

Nagy, A., J. Rossant, et al. (1993). "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A 90(18): 8424-8.

Nakano, T., H. Kodama, et al. (1994). "Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture." Science 265(5175): 1098-101.

Nichols, J., A. Smith, et al. (1998). "Rat and mouse epiblasts differ in their capacity to generate extraembryonic endoderm." Reprod Fertil Dev 10(7-8): 517-25.

Nichols, J., B. Zevnik, et al. (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell 95(3): 379-91.

Nishikawa, S. I., S. Nishikawa, et al. (1998). "Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages." Development 125(9): 1747-57.

Niwa, H. (2001). "Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells." Cell Structure and Function 26(3): 137-48.

Niwa, H. (2007). "How is pluripotency determined and maintained?" Development 134(4): 635-46.

Niwa, H., J. Miyazaki, et al. (2000). "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells." Nat Genet 24(4): 372-6.

Niwa, H., Y. Toyooka, et al. (2005). "Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoderm differentiation." Cell 123(5): 917-29.

Notarianni, E. and J. Flechon (2001). "Parietal endoderm cell line from a rat blastocyst." Placenta 22(1): 111-23.



O'Connor, M. D., M. D. Kardel, et al. (2008). "Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells." Stem Cells 26(5): 1109-16.

Ogawa, K., R. Nishinakamura, et al. (2006). "Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells." Biochemical and Biophysical Research Communications 343(1): 159-66.

Orban, P. C., D. Chui, et al. (1992). "Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A 89(15): 6861-5.

Ouhibi, N., N. F. Sullivan, et al. (1995). "Initial culture behaviour of rat blastocysts on selected feeder cell lines." Mol Reprod Dev 40(3): 311-24.

Palmieri, S. L., W. Peter, et al. (1994). "Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation." Dev Biol 166(1): 259-67.

Palmqvist, L., C. H. Glover, et al. (2005). "Correlation of murine embryonic stem cell gene expression profiles with functional measures of pluripotency." Stem Cells 23(5): 663-80.

Pan, G. and J. A. Thomson (2007). "Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency." Cell Research 17(1): 42-9.

Pan, G. J. and D. Q. Pei (2003). "Identification of two distinct transactivation domains in the pluripotency sustaining factor nanog." Cell Research 13(6): 499-502.

- Pesce, M., M. K. Gross, et al. (1998). "In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ." Bioessays 20(9): 722-32.
- Pesce, M. and H. R. Scholer (2001). "Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development." Stem Cells 19(4): 271-8.
- Petretto, E., R. Sarwar, et al. (2008). "Integrated genomic approaches implicate osteoglycin (Ogn) in the regulation of left ventricular mass." Nat Genet 40(5): 546-52.
- Popova, E., M. Bader, et al. (2006). "Full-term development of rat after transfer of nuclei from two-cell stage embryos." Biol Reprod 75(4): 524-30.
- Ralston, A. and J. Rossant (2005). "Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo." Clinical Genetics 68(2): 106-12.
- Roh, S., J. Guo, et al. (2003). "Birth of rats following nuclear exchange at the 2-cell stage." Zygote 11(4): 317-21.
- Rohwedel, J., K. Guan, et al. (1999). "Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro." Cells Tissues Organs 165(3-4): 190-202.
- Rossant, J. (2001). "Stem cells from the Mammalian blastocyst." Stem Cells 19(6): 477-82.
- Rossant, J. (2007). "Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst." Reprod Fertil Dev 19(1): 111-8.
- Rossant, J. (2008). "Stem cells and early lineage development." Cell 132(4): 527-31.

Rossant, J. and K. M. Vijn (1980). "Ability of outside cells from preimplantation mouse embryos to form inner cell mass derivatives." Dev Biol 76(2): 475-82.

Ruhnke, M., H. Ungefroren, et al. (2003). "Long-term culture and differentiation of rat embryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages." Stem Cells 21(4): 428-36.

Saba-El-Leil, M. K., F. D. Vella, et al. (2003). "An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development." EMBO Rep 4(10): 964-8.

Samuelson, D. J., S. E. Hesselton, et al. (2007). "Rat Mcs5a is a compound quantitative trait locus with orthologous human loci that associate with breast cancer risk." Proc Natl Acad Sci U S A 104(15): 6299-304.

Sato, N., L. Meijer, et al. (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(1): 55-63.

Sauer, B. (1998). "Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system." Methods 14(4): 381-92.

Scholer, H. R., R. Balling, et al. (1989). "Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis." EMBO Journal 8(9): 2551-7.

- Schoonjans, L., V. Kreemers, et al. (2003). "Improved generation of germline-competent embryonic stem cell lines from inbred mouse strains." Stem Cells 21(1): 90-7.
- Schugar, R. C., P. D. Robbins, et al. (2008). "Small molecules in stem cell self-renewal and differentiation." Gene Therapy 15(2): 126-35.
- Silva, J. and A. Smith (2008). "Capturing pluripotency." Cell 132(4): 532-6.
- Smith, A. G. (2001). "Embryo-derived stem cells: of mice and men." Annu Rev Cell Dev Biol 17: 435-62.
- Smith, A. G., J. K. Heath, et al. (1988). "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides." Nature 336(6200): 688-90.
- Smith, A. G. and M. L. Hooper (1987). "Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells." Dev Biol 121(1): 1-9.
- Snow, M. H. (1975). "Embryonic development of tetraploid mice during the second half of gestation." Journal of Embryology and Experimental Morphology 34(3): 707-21.
- Snow, M. H. (1976). "The immediate postimplantation development of tetraploid mouse blastocysts." Journal of Embryology and Experimental Morphology 35(1): 81-6.
- Sobis, H., A. Verstuyf, et al. (1993). "Visceral yolk sac-derived tumors." Int J Dev Biol 37(1): 155-68.

Solter, D. (2006). "From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research." Nat Rev Genet 7(4): 319-27.

Solter, D. and B. B. Knowles (1978). "Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1)." Proc Natl Acad Sci U S A 75(11): 5565-9.

Solter, D., N. Skreb, et al. (1970). "Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma." Nature 227(5257): 503-4.

Spielmann, H., U. Jacob-Muller, et al. (1980). "Immunosurgical studies on inner cell mass development in rat and mouse blastocysts before and during implantation in vitro." Journal of Embryology and Experimental Morphology 60: 255-69.

Stevens, L. C. (1964). "Experimental Production of Testicular Teratomas in Mice." Proc Natl Acad Sci U S A 52: 654-61.

Stevens, L. C. (1970). "The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos." Dev Biol 21(3): 364-82.

Stevens, L. C. and C. C. Little (1954). "Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice." Proc Natl Acad Sci U S A 40(11): 1080-7.

Stewart, C. L., P. Kaspar, et al. (1992). "Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor." Nature 359(6390): 76-9.

Suzuki, A., A. Raya, et al. (2006). "Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A 103(27): 10294-9.

Swanberg, M., O. Lidman, et al. (2005). "MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction." Nat Genet 37(5): 486-94.

Tam, P. P. and J. Rossant (2003). "Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development." Development 130(25): 6155-63.

Tanaka, S., T. Kunath, et al. (1998). "Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4." Science 282(5396): 2072-5.

Tarkowski, A. K., A. Witkowska, et al. (1977). "Development of cytochalasin in B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos." Journal of Embryology and Experimental Morphology 41: 47-64.

Taurog, J. D., L. Lowen, et al. (1988). "HLA-B27 in inbred and non-inbred transgenic mice. Cell surface expression and recognition as an alloantigen in the absence of human beta 2-microglobulin." J Immunol 141(11): 4020-3.

Tesar, P. J., J. G. Chenoweth, et al. (2007). "New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells." Nature 448(7150): 196-9.

Tesson, L., J. Cozzi, et al. (2005). "Transgenic modifications of the rat genome."

Transgenic Res 14(5): 531-46.

Thomas, K. R. and M. R. Capecchi (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." Cell 51(3): 503-12.

Thompson, S., A. R. Clarke, et al. (1989). "Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells." Cell 56(2): 313-21.

Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science 282(5391): 1145-7.

Ueda, S., M. Kawamata, et al. (2008). "Establishment of rat embryonic stem cells and making of chimera rats." PLoS ONE 3(7): e2800.

van den Brandt, J., D. Wang, et al. (2004). "Lentivirally generated eGFP-transgenic rats allow efficient cell tracking in vivo." Genesis 39(2): 94-9.

Vassilieva, S., K. Guan, et al. (2000). "Establishment of SSEA-1- and Oct-4-expressing rat embryonic stem-like cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth." Exp Cell Res 258(2): 361-73.

Wang, Z. and R. Jaenisch (2004). "At most three ES cells contribute to the somatic lineages of chimeric mice and of mice produced by ES-tetraploid complementation." Dev Biol 275(1): 192-201.

- Williams, R. L., D. J. Hilton, et al. (1988). "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells." Nature 336(6200): 684-7.
- Wobus, A. M. and K. R. Boheler (2005). "Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy." Physiol Rev 85(2): 635-78.
- Wobus, A. M., H. Holzhausen, et al. (1984). "Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo." Exp Cell Res 152(1): 212-9.
- Wodarz, A. and R. Nusse (1998). "Mechanisms of Wnt signaling in development." Annu Rev Cell Dev Biol 14: 59-88.
- Xu, R. H., R. M. Peck, et al. (2005). "Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells." Nat Methods 2(3): 185-90.
- Yamaguchi, T. P. (2001). "Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning." Current Biology 11(17): R713-24.
- Ying, Q. L., J. Nichols, et al. (2003). "BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3." Cell 115(3): 281-92.
- Yoo, J. G., S. P. Demers, et al. (2007). "Developmental arrest and cytoskeletal anomalies of rat embryos reconstructed by somatic cell nuclear transfer." Cloning and Stem Cells 9(3): 382-93.



Young-Pearse, T. L., J. Bai, et al. (2007). "A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference." Journal of Neuroscience 27(52): 14459-69.

Yu, J. and J. A. Thomson (2008). "Pluripotent stem cell lines." Genes and Development 22(15): 1987-97.

Zhang, J. G., C. M. Owczarek, et al. (1997). "Evidence for the formation of a heterotrimeric complex of leukaemia inhibitory factor with its receptor subunits in solution." Biochemical Journal 325 ( Pt 3): 693-700.

Zhou, Q., J. P. Renard, et al. (2003). "Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation." Science 302(5648): 1179.

Zwaka, T. P. and J. A. Thomson (2005). "A germ cell origin of embryonic stem cells?" Development 132(2): 227-33.