



HAL
open science

Colonisation embryonnaire et compétence chimérique des cellules souches pluripotentes : étude chez la souris, le lapin et le chimpanzé

Yannicke Pijoff

► **To cite this version:**

Yannicke Pijoff. Colonisation embryonnaire et compétence chimérique des cellules souches pluripotentes : étude chez la souris, le lapin et le chimpanzé. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2024. Français. NNT : 2024LYO10255 . tel-04845470

HAL Id: tel-04845470

<https://theses.hal.science/tel-04845470v1>

Submitted on 18 Dec 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**École Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)**

Discipline : Biologie Cellulaire

Soutenue publiquement le 02/12/2024, par :
Yannicke PIJOFF

**Colonisation embryonnaire et
compétence chimérique des cellules
souches pluripotentes : étude chez la
souris, le lapin et le chimpanzé**

Devant le jury composé de :

MOYRET-LALLE , Caroline	Professeure des universités, UCBL, CRCL, Lyon	Présidente
CHAZAUD , Claire	Directrice de recherche, UCA, iGReD, Clermont-Ferrand	Rapporteuse
ACLOQUE , Hervé	Chargé de recherche, Université Paris-Saclay, GABI, Jouy-en-Josas	Rapporteur
OSTEIL , Pierre	Maitre de conférences, UCA, iGReD, Clermont-Ferrand	Examineur
AKSOY , Irène	Chargée de recherche, UCBL, SBRI, Lyon	Invitée
AFANASSIEFF , Marielle	Chargée de recherche, UCBL, SBRI, Lyon	Directrice de thèse
SAVATIER , Pierre	Directeur de recherche, UCBL, SBRI, Lyon	Directeur de thèse



Colonisation embryonnaire et compétence chimérique des cellules souches pluripotentes : étude chez la souris, le lapin et le chimpanzé

Résumé

Les cellules souches pluripotentes (PSC) naïves ont la capacité de réintégrer le développement embryonnaire normal et de produire des foetus chimériques chez les rongeurs. Cependant, les PSC naïves provenant d'espèces autres que les rongeurs présentent une capacité nettement moins efficace à coloniser les embryons. Actuellement, notre compréhension des mécanismes impliqués dans la formation des chimères est limitée. Le projet avait pour objectif de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la capacité des PSC à coloniser l'embryon pré-implantatoire.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques spécifiques des PSC capables de coloniser. Au laboratoire nous avons obtenus des lignées de PSC de lapin et une lignée de PSC de chimpanzé capable de coloniser l'embryon pré-implantatoire de lapin. Nous avons alors séquencé et analysé le transcriptome de ces lignées de PSC de lapin et de chimpanzé pour identifier les caractéristiques moléculaires des PSC capables de coloniser. Ainsi, nous avons montré que les PSC capables de coloniser active la signalisation PI3K, répriment la signalisation Hippo et modulent les voies impliquées dans les interactions cellulaires et la régulation du cytosquelette.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires intervenant durant la colonisation de l'embryon par les PSC. Pour cela, nous avons séquencé des embryons de lapin chimériques 48h après injection de PSC de chimpanzé ou de souris capables de coloniser. L'analyse du transcriptome des PSC injectées a révélé une augmentation de la signalisation PI3K/AKT ainsi que des voies de signalisations impliquées dans les jonctions cellulaires, les adhésions cellulaires et les régulations du cytosquelette, suggérant des interactions hôte-PSC injectés. De plus, l'analyse a également révélé qu'une partie de l'épiblaste de l'embryon hôte est composé de PSC injectées sans altération de l'identité de l'hôte.

En conclusion, lors de la colonisation, les PSC et les cellules de l'embryon hôte interagissent et communiquent pour harmoniser leur développement.

Embryo colonization and chimeric competence of pluripotent stem cells : a study in mice, rabbits and chimpanzees

Abstract

Naïve pluripotent stem cells (PSC) possess the ability to re-enter normal development and generate chimeric fetuses in rodents. However, naïve PSCs from non-rodent species exhibit a significantly less efficient capacity to colonize embryos. Currently, our understanding of the mechanisms involved in chimera formation is limited. The project aimed to decipher these mechanisms.

Firstly, we focused on hallmarks of chimeric competent PSCs. In the lab, we obtained chimeric competent PSCs in rabbit and chimpanzee that we analyzed by RNA sequencing analysis to identify the molecular signature of chimeric competent PSCs. We showed that rabbit, chimpanzee as well as mouse PSCs enhance PI3K/AKT signaling, downregulate Hippo signaling and modulate cellular interactions and regulation of cytoskeleton.

Secondly, we investigated mechanisms taking place during embryo colonization by PSCs. To this aim, we performed a single-cell RNA sequencing analysis of rabbit embryos colonized by chimpanzee and mouse PSCs. The analysis revealed that injected PSCs increased PI3K/AKT signaling and other signaling pathways involved in cell junction, cell adhesion, and cytoskeleton regulations, suggesting interactions between host embryo cells and injected PSCs. This analysis also revealed that part of the host epiblast is replaced by injected PSCs without any changes of the host cells' identity.

To conclude, during colonization, PSC and cells from the host embryos interact and communicate for efficient colonization.

Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à toutes les personnes sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

Je remercie, tout d'abord, Colette Dehay, directrice du Stem Cell and Brain Research Institute, de m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche.

Je remercie également Pierre Savatier, directeur de l'équipe, de m'avoir permis d'intégrer son équipe de recherche pour mes stages de master et ma thèse. Merci pour toutes ces discussions enrichissantes autour du projet, des données transcriptomiques, de l'intégrité scientifique, et même des vaisseaux *Starship*. Merci d'être un chef bienveillant, juste et attentif.

Je remercie très chaleureusement Irène, qui m'a accordé sa confiance. Merci, Aïe-rine, pour ton encadrement exceptionnel, ton écoute, ta motivation et ton soutien indéfectible, même dans mes moments de doute et de panique. Merci de m'avoir tant fait progresser. Je suis extrêmement reconnaissante d'avoir pu travailler à tes côtés. Merci également pour tout le temps passé à discuter du projet, à corriger mes présentations, à papoter et à rire.

Je tiens aussi à remercier Marielle, qui m'a donné l'opportunité de faire mes premiers pas en thèse, et qui m'a appris à produire et manipuler les embryons de lapin, mais aussi à cultiver les PSC de lapin, ce qui est loin d'être une tâche facile.

Je n'oublie pas de remercier Guillaume Marcy, qui a pris de son temps pour m'apprendre la bioinformatique. Sans sa précieuse formation et ses conseils avisés, les analyses de ce manuscrit n'auraient jamais pu voir le jour.

Je remercie Pierre-Yves d'avoir été un excellent encadrant de stage. Merci à toi d'avoir pris le temps de m'expliquer les manip, de m'apprendre à cultiver les ESC de souris, de corriger mes rapports de stage et de m'entraîner pour BMIC.

Merci à Nathalie pour son aide précieuse lors des manip lapins, ainsi que pour l'encadrement et la supervision du papier KEP.

Je remercie également Thierry Joly pour tous les embryons de lapin qu'il a produit (et toutes les stimulations que cela implique).

Un grand merci à Véronique et Naoel, les deux super secrétaires du SBRI, pour leur aide avec les ordres de mission, les galères administratives et la gestion de la logistique du Student Club.

Je tiens à remercier Thierry Blachère pour toutes les discussions mais aussi les commandes et leurs galères qu'il a affronté pour nous permettre de travailler au mieux, ainsi que Nathalie Doerflinger pour nos discussions intéressantes et tous les plasmides qu'elle produit généreusement pour nous.

Je remercie également tout le personnel de l'animalerie qui s'occupe quotidiennement de nos lapins.

Je tiens à remercier les anciens et nouveaux étudiants de l'équipe : Wilhelm, Florence, Etienne, Charlotte, Agathe, Tahereh, Anaïs, Pöre, Pook, Katerina et Hong, ainsi que les stagiaires, pour toutes les discussions enrichissantes et les moments de franche rigolade dans le bureau.

Wilhelm, je te remercie pour tous ces souvenirs de manips, notamment le tri des embryons E6.0 à la cuillère ! Merci pour ton sens de l'humour, pour ton côté très alsacien, mais aussi pour ta patience et ta gentillesse ! Promis, on viendra te voir en Belgique, en Alsace ou même ailleurs !

Agathe, je tiens à te remercier d'être devenue une véritable amie. Nos cafés du matin me manquent déjà, tout comme nos discussions sur les mariages, les voyages, les manipulations, les réunions d'équipe. Merci d'être si drôle et d'avoir été mon acolyte de thèse durant ces trois dernières années. Je te souhaite une très belle fin de thèse !

Je remercie également la fabuleuse Cloé, qui est un véritable rayon de soleil ! Merci d'être la personne souriante, bienveillante, joviale et dévouée en amitié que tu es. Merci pour toute ton aide en culture, mais aussi pour nos petites discussions et confidences qui vont me manquer. Évidemment, notre porte reste grande ouverte pour venir prendre l'apéro !

Je remercie également tous mes amis qui ont su m'écouter, me comprendre, me soutenir et m'encourager : Bérénice, Nadjima, Alicia, Zac, Mathilde, Nico, Béa, Guillaume, Marine, Lucas et ceux que j'oublie dans la précipitation de la fin de thèse (mais vous me pardonnerez avec une bière).

Un immense merci à ma famille, qui a toujours été là pour moi. Merci Papa et Maman de m'aimer et d'avoir toujours cru en moi. Merci Anna et Véna d'être les meilleures sœurs du monde et de me supporter depuis tout ce temps. Merci Pépé pour toute ta bienveillance et ton affection. Je remercie également mes deux grand-mères, qui seraient très fières de moi, j'en suis certaine. Un grand merci aussi à ma belle-famille pour sa gentillesse et sa bienveillance.

Enfin, je remercie tendrement Etienne. Merci d'être la personne qui me fait le plus rire, d'être si attentionné et de m'aimer telle que je suis. Merci d'avoir supporté mes baisses de morale durant l'écriture de ce manuscrit, de m'avoir rassurée et d'avoir été un soutien sans faille. Merci également pour ta précieuse relecture de dernière minute. Je te suis reconnaissante pour ta bienveillance, ton soutien, ton enthousiasme, ta curiosité, et surtout ton amour, qui rendent le quotidien si agréable à tes côtés. Je suis extrêmement heureuse de partager ta vie. Je t'aime très fort.

Pour tout l'impact positif que tu as eu, Etienne, et que tu continues d'avoir sur ma vie, aussi bien scientifiquement que personnellement, je te dédie ce manuscrit de thèse.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Remerciements.....	7
Table des matières.....	11
Table des figures et tableaux	15
Abréviations	19
Introduction.....	21
1. Le développement embryonnaire précoce	21
1.1. Le modèle murin comme référence	21
1.1.1. Les grandes étapes du développement embryonnaire précoce	21
1.1.2. Première ségrégation de lignage : apparition de la pluripotence <i>in vivo</i>	24
1.1.3. Seconde ségrégation de lignage : apparition de l'épiblaste	26
1.1.4. Pluripotence <i>in vivo</i> et production de chimères.....	27
1.2. Le primate comme objectif final	30
1.2.1. Le développement embryonnaire précoce chez les primates.....	30
1.2.2. Chimères <i>in vivo</i> chez les primates.....	31
1.3. L'embryon de lapin comme modèle alternatif	32
1.3.1. Le développement embryonnaire précoce chez le lapin.....	32
1.3.2. Chimères <i>in vivo</i> chez le lapin.....	33
2. Lignées de cellules souches pluripotentes	34
2.1. Chez la souris.....	34
2.1.1. Capture de la pluripotence <i>in vitro</i>	34
2.1.2. Régulation de la pluripotence naïve et amorcée.....	37
2.1.3. Entre la pluripotence naïve et amorcée : l'état formatif.....	47
2.1.4. Capacité de colonisation des PSC chez la souris.....	49
2.2. Chez le lapin	57
2.2.1. Capture de la pluripotence <i>in vitro</i>	57
2.2.2. Caractéristiques de la pluripotence naïve	59
2.2.3. Capacité de colonisation des PSC	60
2.3. Chez les primates.....	61
2.3.1. Capture de la pluripotence <i>in vitro</i> chez les primates	61
2.3.2. Pluripotence naïve chez les primates	67
2.3.3. Pluripotence formative chez les primates	71
2.3.4. Capacité de colonisation des PSC de primates	71
3. Enseignements tirés des chimères chez les mammifères	76
3.1. L'équivalence développementale	76
3.2. La proximité évolutive	77
3.3. La survie cellulaire	78
3.3.1. Apoptose	78

3.3.2. Compétition cellulaire	78
4. <i>Projet de thèse</i>	79
<i>Résultats</i>.....	81
1. <i>Signature transcriptomique des PSC capables de coloniser l'embryon pré-implantatoire</i>	81
1.1. Chez le lapin	81
1.1.1. Initiation de la reprogrammation vers l'état naïf de pluripotence grâce à la condition de culture VALGÖX	81
1.1.2. Capture d'un état de pluripotence pseudo-naïf grâce au cocktail de gènes <i>KLF2/ERAS/PRMT6</i>	84
1.1.3. Étude de la colonisation des embryons de lapin par les cellules KEP	89
1.1.4. Signature transcriptomique des cellules KEP	91
1.1.5. Capacité de colonisation embryonnaire des cellules KEPI_VAL exprimant CD75.....	97
1.1.6. Signature transcriptomique des cellules KEPI_VAL CD75 ^{high}	98
1.1.7. Conclusions.....	100
1.2. Chez les primates.....	101
1.2.1. Capture d'un état de pluripotence pseudo-naïf grâce à la méthode de reprogrammation (V)ALGÖX.....	101
1.2.2. Colonisation des embryons pré-implantatoires par les PSC de chimpanzé cultivées en condition (V)ALGÖX.....	104
1.2.3. Signature transcriptomique des PSC de chimpanzé	106
1.2.4. Conclusions.....	109
1.3. Comparaison inter-espèces des lignées de PSC capables de coloniser l'embryon pré-implantatoire.....	110
1.3.1. Étude transcriptomique des lignées des PSC de lapin, de chimpanzé et de souris capables de coloniser	110
1.3.2. Conclusions.....	113
2. <i>Étude des changements transcriptomiques survenant lors de la colonisation de l'embryon de lapin par les PSC</i>	114
2.1. Séquençage ARN sur cellule unique de blastocystes de lapin chimériques	114
2.2. Étude des changements transcriptomiques des PSC durant la colonisation de l'embryon de lapin.....	116
2.2.1. Sortie de la pluripotence naïve des PSC après injection.....	119
2.2.2. Métabolisme énergétique des PSC après injection	124
2.2.3. Modifications du cycle cellulaire des PSC après injection	126
2.2.4. Survie des PSC après injection.....	128
2.2.5. Étude non biaisée du transcriptome des PSC de chimpanzé lors de la colonisation de l'embryon de lapin	130
2.2.6. Étude fonctionnelle de la signalisation PI3K/AKT dans les PSC de chimpanzé lors de la colonisation de l'embryon de lapin	135
2.2.7. Étude non biaisée du transcriptome des PSC de souris lors de la colonisation de l'embryon de lapin	137
2.2.8. Conclusions.....	141
2.3. Étude des changements transcriptomiques des cellules de l'embryon de lapin hôte durant la colonisation	142
<i>Discussion</i>.....	147

1. Une approche non biaisée permettant d'identifier les mécanismes liés à la capacité de colonisation des PSC	147
2. Compétition cellulaire et capacité de colonisation	149
2.1. Compétition cellulaire et capacité de colonisation : Implication de la voie NF- κ B.....	150
2.2. La signalisation PI3K/AKT est un acteur majeur de la colonisation embryonnaire	150
2.2.1. La voie PI3K/AKT et l'apoptose	151
2.2.2. La voie PI3K/AKT et la régulation du cycle cellulaire	152
2.2.3. La voie PI3K/AKT et le métabolisme	152
3. Interactions cellulaires et capacité de colonisation	153
3.1. Interactions cellulaires et régulation du cytosquelette.....	154
3.1.1. Les intégrines	154
3.1.2. Les éphrines	155
3.1.3. Les sémaphorines	156
3.1.4. La matrice extracellulaire	156
3.2. Interactions cellulaires et signalisation Hippo	157
4. Réintégration du développement embryonnaire et colonisation.....	158
Matériel et Méthodes	161
Lignées cellulaires et milieux de culture	161
PSC de lapin	161
PSC de primates	163
PSC de souris.....	163
Tri cellulaire des cellules CD75^{high}	164
Production et culture d'embryons de lapin	164
Microinjections.....	164
Immunofluorescences.....	165
Immunomarquages sur cellules.....	165
Immunomarquages sur embryons.....	165
Western Blot.....	168
Séquençages ARN	169
Séquençage ARN des PSC de lapin.....	169
Séquençage ARN des PSC de primates	169
Séquençage ARN des embryons chimères.....	170
Analyses bioinformatiques.....	170
Transcriptome des PSC	170
Transcriptome des embryons en cellule unique.....	171
Disponibilité des données.....	171
Statistiques.....	171
Références bibliographiques	173
Annexes.....	207
I. Données supplémentaires	207

Tableau S1	207
Tableau S2	208
Tableau S3	209
<i>II. Article 1</i>	211

Table des figures et tableaux

Introduction

Figure 1 : Développement embryonnaire pré- et post-implantatoire chez la souris.....	23
Figure 2 : Mécanismes moléculaires impliqués dans l'émergence des cellules de la masse cellulaire interne (ICM) puis des cellules de l'épiblaste (EPI) chez la souris.....	25
Figure 3 : Méthodes expérimentales pour la formation de chimères.....	28
Figure 4 : Développement embryonnaire précoce des primates, lapin et souris.....	31
Figure 5 : Continuum de pluripotence – les PSC chez la souris et leurs équivalents développementaux.....	36
Figure 6 : Facteurs extrinsèques et voies de signalisation régulant la pluripotence naïve et amorcée chez la souris.....	39
Figure 7 : Réseau de facteurs de transcription régulant la pluripotence chez la souris.....	41
Figure 8 : Caractéristiques de la pluripotence naïve et la pluripotence amorcée chez la souris.....	43
Figure 9 : Réseau de facteurs de transcription régulant la pluripotence formative chez la souris.....	49
Figure 10 : Gradient de chimérisme intra-espèce des PSC chez la souris.....	53
Figure 11 : Gradient de chimérisme inter-espèce des PSC de souris.....	55
Figure 12 : Caractéristiques de la pluripotence naïve et la pluripotence amorcée chez le lapin.....	58
Figure 13 : Facteurs extrinsèques et voies de signalisation régulant la pluripotence naïve chez les primates.....	65
Figure 14 : Caractéristiques de la pluripotence naïve chez les primates.....	70
Figure 15 : Prérequis connus pour la formation de chimères.....	77
Tableau 1 : Potentiel développemental des cellules in vivo chez la souris.....	29
Tableau 2 : Potentiel développemental des PSC chez la souris après injection dans un embryon pré-implantatoire.....	52
Tableau 3 : Capacité de colonisation des différentes lignées de PSC de souris après injection dans des embryons pré-implantatoires de souris.....	52

Tableau 4 : Capacité de colonisation des PSC de rongeurs après injection dans des embryons pré-implantatoires de différentes espèces.....	55
Tableau 5 : Capacité de colonisation des différentes lignées de PSC de lapin après injection dans des embryons pré-implantatoires précoces de lapin.....	60
Tableau 6 : Composition des différents milieux de conversion vers l'état naïf de pluripotence des PSC de primates.	66
Tableau 7 : Capacité de colonisation des différentes lignées de PSC de primates après injection dans des embryons pré-implantatoires précoces de la même espèce.....	73
Tableau 8 : Capacité de colonisation de différentes lignées de PSC de primate après injection dans des embryons pré-implantatoires précoces d'autres espèces.....	75

Résultats

Figure 16 : Le milieu de culture VALGÖX initie la conversion des cellules iPSC de lapin vers l'état naïf de pluripotence.....	83
Figure 17 : Les gènes <i>KLF2/ERAS/PRMT6</i> associés au milieu VALGÖX permettent la capture d'un état de pluripotence pseudo-naïf.....	86
Figure 18 : L'état de pluripotence pseudo-naïf des cellules iPSC de lapin dépend de l'expression des gènes <i>KLF2/ERAS/PRMT6</i>	88
Figure 19 : Les cellules <i>KEP_VAL</i> , surexprimant <i>KLF2</i> , <i>ERAS</i> et <i>PRMT6</i> , colonisent l'embryon de lapin.....	90
Figure 20 : La signature transcriptomique des iPSC <i>KEP_VAL</i> est associée à une régulation positive du métabolisme des acides aminés et une régulation négative des voies <i>MAPK</i> , <i>WNT</i> , <i>Hippo</i> et du guidage axonal.....	94
Figure 21 : La signature transcriptomique associée à l'extinction des transgènes <i>KEP</i> est l'image en miroir des changements transcriptomiques observés dans les cellules <i>KEP_VAL</i>	96
Figure 22 : Les cellules <i>KEPi_VAL+S CD75high</i> colonisent très efficacement l'embryon de lapin.....	97
Figure 23 : La signature transcriptomique des iPSC <i>KEPi_VAL+S CD75high</i> est associée à une régulation positive de la survie cellulaire et de la synthèse d'ARN, une régulation négative des voies <i>MAPK/JNK</i> et <i>NF-κB</i> , ainsi qu'une modulation des interactions cellulaires.....	99
Figure 24 : Caractéristiques transcriptomiques des iPSC de lapin associées à une capacité de colonisation élevée.....	100
Figure 25 : Les PSC de primates cultivées dans le milieu (V)ALGÖX s'auto-renouvellent dans un état de pluripotence pseudo-naïf.....	103

Figure 26 : Les PSC de chimpanzé (V)ALGöX colonisent très efficacement l’embryon de lapin	105
Figure 27 : La signature transcriptomique spécifique de la conversion (V)ALGöX des PSC de chimpanzé est associée à une régulation positive de la voie PI3K/AKT, des interactions cellulaires et du cytosquelette ainsi qu’à une régulation négative de l’apoptose et la signalisation NF-κB.....	108
Figure 28 : Caractéristiques transcriptomiques des cellules chiPSC-(V)ALGöX associées à une capacité de colonisation élevée.....	109
Figure 29 : La signature transcriptomique commune aux cellules KEPI_VAL+S CD75 ^{high} , chiPSC-(V)ALGöX et mESC 2iLIF est associée à une régulation positive de la voie PI3K/AKT, une régulation négative des voies MAPK/JNK, Hippo et de l’apoptose, ainsi qu’une modulation des interactions cellulaires et des régulations du cytosquelette.....	112
Figure 30 : Caractéristiques transcriptomiques communes aux cellules KEPI_VAL+S CD75 ^{high} , chiPSC-(V)ALGöX et mESC 2iLIF, associées à une capacité de colonisation élevée	113
Figure 31 : Séquençage ARN sur cellule unique d’embryon chimère grâce à la technologie <i>CellenONE</i>	115
Figure 32 : <i>Pre-processing</i> des données de séquençage ARN sur cellule unique de la lignée cellulaire chiPSC (V)ALGöX avant et après injection.....	117
Figure 33 : <i>Pre-processing</i> des données de séquençage ARN sur cellule unique de la lignée cellulaire mESC LIF/FCS avant et après injection.....	118
Figure 34 : Les cellules chiPSC et mESC sont dans un état développemental moins immature après injection dans l’embryon de lapin.....	121
Figure 35 : Les cellules chiPSC et mESC sortent de la pluripotence naïve après injection dans l’embryon de lapin.....	123
Figure 36 : Les cellules chiPSC et mESC réduisent leur métabolisme énergétique lors de la colonisation de l’embryon de lapin.....	125
Figure 37 : Les cellules chiPSC et mESC ralentissent leur cycle cellulaire lors de la colonisation de l’embryon de lapin.....	127
Figure 38 : Les cellules chiPSC et mESC évitent l’apoptose lors de la colonisation de l’embryon de lapin.....	129
Figure 39 : Les cellules chiPSC régulent positivement les voies PI3K/AKT, WNT et MAPK ainsi que les projections neuronales, les adhésions cellulaires et le cytosquelette après injection dans l’embryon de lapin.....	132
Figure 40 : Les cellules chiPSC régulent négativement la traduction protéique et le métabolisme énergétique après injection dans l’embryon de lapin.....	134
Figure 41 : Les cellules chiPSC-(V)ALGöX dépendent de la signalisation PI3K/AKT pour coloniser efficacement l’embryon de lapin.....	136

Figure 42 : Les cellules mESC régulent positivement l'épissage des ARN, le remodelage de la chromatine, les projections neuronales, les adhésions cellulaires et le cytosquelette après injection dans l'embryon de lapin.....	139
Figure 43 : Les cellules mESC régulent négativement la traduction protéique et le métabolisme énergétique après injection dans l'embryon de lapin.....	140
Figure 44 : Le transcriptome des embryons de lapin ne varie pas en réponse à l'injection de PSC de chimpanzé ou de souris.....	143
Figure 45 : Les cellules de l'épiblaste des embryons colonisés sont remplacées par les PSC de souris et de chimpanzé injectées.....	146

Discussion

Figure 46 : Les embryons de lapin expriment le gène codant le récepteur EPHA1.....	155
Figure 47 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la capacité de colonisation des PSC de lapin, de chimpanzé et de souris.....	159

Matériel et méthodes

Tableau A : Composition du milieu de culture VALGöX.....	162
Tableau B : Composition du milieu N2B27 et du supplément N2 (100X).....	162
Tableau C : Anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages.....	167
Tableau D : Anticorps secondaires utilisés pour les immunomarquages.....	168

Annexes

Tableau S1 : Compétence chimérique intra-espèce des PSC de souris.....	208
Tableau S2 : Compétence chimérique intra-espèce des PSC de lapin.....	209
Tableau S3 : Compétence chimérique inter-espèce des PSC de primate.....	210

Abréviations

Bmp4 :	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>
CDK :	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
chiPSC	<i>chimpanzee induced Pluripotent Stem Cells</i>
DEG :	<i>Differentially Expressed Genes</i>
DIV :	<i>Days In Vitro</i>
DNMT :	<i>DNA methyltransferase</i>
EGA :	<i>Embryonic Genome Activation</i>
EPI :	<i>Epiblaste</i>
EpiLC :	<i>Epiblast-Like Cells</i>
EpiSC :	<i>Epiblast Stem Cells</i>
EPS :	<i>Extended Pluripotent Stem cells</i>
EPSC :	<i>Expanded Potential Stem Cells</i>
Erk :	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
ESC :	<i>Embryonic Stem Cells</i>
FGF :	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FS :	<i>Formative Stem cells</i>
GFP :	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GO :	<i>Gene Ontology</i>
Gsk3 :	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
HDAC :	<i>Histone Deacetylase</i>
hESC :	<i>human Embryonic Stem Cells</i>
hiPSC :	<i>human induced Pluripotent Stem Cells</i>
hPSC :	<i>human Pluripotent Stem Cells</i>
ICM :	<i>Inner Cell Mass</i>
Id :	<i>Inhibitor of differentiation</i>
iPSC :	<i>induced Pluripotent Stem Cells</i>
KEGG :	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KSR :	<i>Knockout™ Serum Replacement</i>
LIF :	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
maESC :	<i>marmoset Embryonic Stem Cells</i>
MAPK :	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEF :	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
Mek :	<i>Map/Erk Kinase</i>
mESC :	<i>mouse Embryonic Stem Cells</i>
OXPHOS :	<i>Oxidative Phosphorylation</i>
PCA :	<i>Principal Component Analysis</i>
PGC :	<i>Primordial Germ cells</i>
PKC :	<i>Protein Kinase C</i>

PrE : *Primitive Endoderm*
PSC : *Pluripotent Stem Cells*
rbESC : *rabbit Embryonic Stem Cells*
rbiPSC : *rabbit induced Pluripotent Stem Cells*
rhESC : *rhesus Embryonic Stem Cells*
Smad : *Suppressor of mothers against decapentaplegic*
Stat3 : *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*
TE : *Trophectoderme*
UMAP : *Uniform Manifold Approximation and Projection*
VPA : *Valporic Acid*

Introduction

1. Le développement embryonnaire précoce

Durant l'embryogenèse les cellules souches de l'embryon, ayant un potentiel de développement et différenciation illimités, se différencient et se spécialisent progressivement pour devenir spécifiques d'un tissu adulte. Grâce à sa petite taille, son temps de gestation court, sa fécondité élevée et son faible coût, la souris (*Mus musculus*) est depuis plus de 50 ans le modèle de mammifère le plus utilisé pour étudier le développement embryonnaire (Taft, 2008). Dans cette section, nous nous intéresserons à l'embryogenèse chez la souris.

1.1. Le modèle murin comme référence

1.1.1. Les grandes étapes du développement embryonnaire précoce

L'embryogenèse précoce commence par la fécondation produisant un zygote et se termine avec la gastrulation (Figure 1). Chez la souris, au jour embryonnaire 1.5 (*Embryonic days* 1.5 ou E1.5), le zygote se divise une première fois pour former un embryon à deux cellules appelées blastomères. Les blastomères sont totipotents, c'est-à-dire qu'ils ont le potentiel pour se différencier en cellules des lignages embryonnaires mais aussi extra-embryonnaires. De ce fait, un blastomère isolé possède le potentiel pour se développer en un organisme adulte (Tarkowski, 1959; Tarkowski and Wróblewska, 1967). A E1.5 (stade 2-cellules) survient l'activation du génome embryonnaire (*Embryonic Genome Activation* ou EGA) où le génome de l'embryon est transcrit et l'embryon ne dépend plus des transcrits maternels (Flach et al., 1982). Après deux autres divisions cellulaires symétriques, l'embryon atteint le stade 8-cellules à E2.5. Les blastomères se compactent alors, donnant une forme de mûre à l'embryon que l'on appelle *morula*. A E3.0 a lieu la première ségrégation de lignage dans la morula compactée. Les blastomères externes se différencient en cellules du trophoctoderme (TE) à l'origine des annexes extra-embryonnaires comme le placenta. Les blastomères internes forment ensuite la masse cellulaire interne (*Inner Cell Mass* ou ICM). Cette première ségrégation de lignage marque l'entrée dans l'état de pluripotence. Les cellules pluripotentes, formant l'ICM, ont le potentiel pour se différencier dans les trois lignages embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme) et leurs dérivés à l'origine de l'organisme adulte.

Cependant, les cellules pluripotentes de l'ICM ne peuvent pas se différencier en TE et ne peuvent donc pas produire un organisme entier (Rossant and Lis, 1979). Entre E3.0 et E3.5 une cavité, le blastocèle, apparaît. L'embryon devient alors le blastocyste précoce. Dès E3.5, l'ICM est soumis à la seconde ségrégation de lignage. Une première sous-population de cellules se différencie en endoderme primitif (*Primitive Endoderm* ou PrE) à l'origine de l'endoderme viscéral et pariétal du sac vitellin. La seconde sous-population se spécifie en cellules de l'épiblaste (EPI) qui correspond au futur compartiment embryonnaire. Dans le blastocyste tardif, à E4.5, les cellules de l'EPI et du PrE sont totalement ségrégées. L'EPI est entouré de TE et bordé de PrE le séparant du blastocèle (Schrode et al., 2013; Piliszek et al., 2016). A E4.75, les cellules de l'EPI se polarisent et forment une rosette, puis à E5.0 un lumen se forme au milieu de la rosette d'EPI. Au même moment (~E5.0) l'embryon s'implante dans l'utérus. L'embryon s'allonge alors, et le lumen s'étend pour créer une deuxième cavité (Bedzhov and Zernicka-Goetz, 2014). A E5.5 l'embryon forme un ovo-cylindre où l'EPI, toujours pluripotent, est un épithélium concave. Dans les embryons femelles XX, dès E5.5, les cellules de l'EPI commencent à inactiver de manière aléatoire un des deux chromosomes X (Kobayashi et al., 2016). A E6.6, les premières cellules d'EPI se différencient en mésoderme au niveau de la ligne primitive, c'est le début de la gastrulation (Bardot and Hadjantonakis, 2020). Les cellules de l'EPI commencent à sortir de l'état de pluripotence.

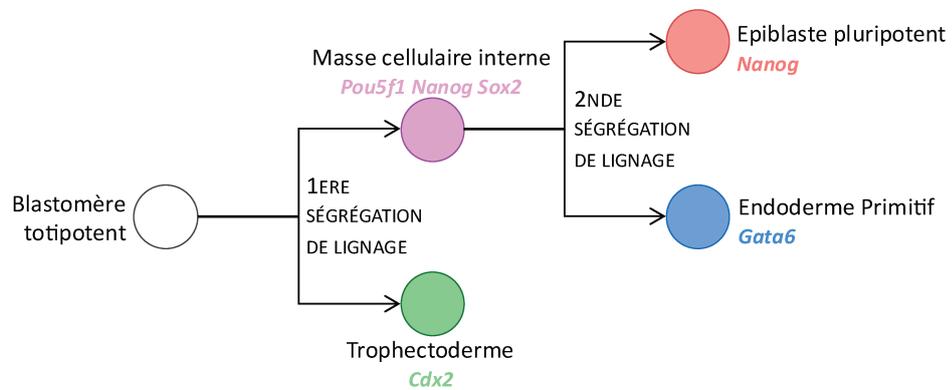
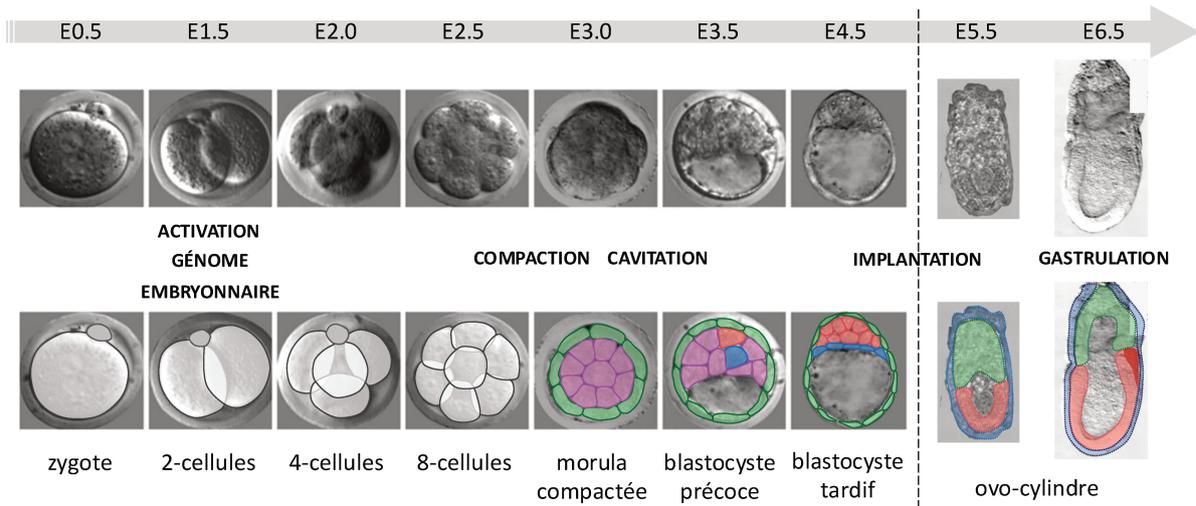


Figure 1 : Développement embryonnaire pré- et post-implantatoire chez la souris.

Images de microscopie d'embryons de souris de la fécondation au début de la gastrulation (première ligne) ainsi que les différents lignages associés (seconde ligne). La première ségrégation de lignage survient au stade 8-cellules chez la souris par spécification des blastomères totipotents en cellules de trophoctoderme ou cellules de la masse cellulaire interne. La seconde ségrégation de lignage à lieu à E3.5 où les cellules de l'ICM se spécifient en cellules pluripotentes de l'épiblaste ou en cellules de l'endoderme primitif.

(Modifiée d'après Schrode et al., 2013)

1.1.2. Première ségrégation de lignage : apparition de la pluripotence *in vivo*

La première ségrégation de lignage est la première étape de différenciation dans l'embryon précoce. Elle marque la sortie de l'état de totipotence et l'émergence de la pluripotence. Chez la souris, à partir du stade 8-cellules, les cellules externes de l'embryon se polarisent (Johnson and Ziomek, 1981). Elles se différencient en cellules de TE tandis que les cellules internes deviennent pluripotentes et forment l'ICM.

Un régulateur majeur de l'identité des cellules du TE est le facteur de transcription Cdx2 (Caudal-related homeobox 2). L'expression de Cdx2 est spécifique aux cellules du TE et aux cellules externes de la morula compactée, cellules précurseurs de TE (Dietrich and Hiiragi, 2007; Strumpf et al., 2005). En effet, les embryons mutants *Cdx2* *-/-* ne développent pas de TE fonctionnel (Strumpf et al., 2005) prouvant l'implication de Cdx2 dans l'identité des cellules de TE.

Un régulateur majeur de l'identité des cellules de l'ICM est le facteur de transcription à homéodomaine Nanog. Il est exprimé dans les cellules de l'embryon dès le stade 8-cellules. L'expression de Nanog est ensuite restreinte aux cellules de l'ICM et à celles de l'EPI (Chambers et al., 2003). Les ICM isolées à partir d'embryons *Nanog* *-/-* et mis en culture se différencient en endoderme pariétal ce qui démontre l'implication de Nanog dans le maintien de l'identité des cellules pluripotentes de l'ICM (Mitsui et al., 2003). Le facteur de transcription Oct4 (Octamer-binding transcription factor 4), encodé par le gène *Pou5f1* (*POU domain Class 5 Homeobox 1*) est un second gardien de l'identité des cellules pluripotentes de l'ICM. Il est exprimé dans les blastomères, puis son expression est confinée à l'ICM et l'EPI (Rosner et al., 1990). L'inactivation du gène *Pou5f1* induit l'absence d'ICM dans les embryons précoces, ainsi que la différenciation des blastomères internes en cellule du TE (Nichols et al., 1998). En effet, l'expression d'Oct4 inhibe la différenciation en TE des cellules de l'ICM, protégeant leur identité pluripotente. Un troisième facteur est impliqué dans le maintien de la pluripotence dans les cellules de l'ICM : le facteur de transcription Sox2 (SRY-related HMG box 2). Sox2 est exprimé dans les blastomères au stade morula, puis dans les cellules de l'ICM et de l'EPI au stade blastocyste (Avilion et al., 2003). L'inactivation du gène *Sox2* provoque l'absence d'ICM dans les embryons précoces ainsi qu'une diminution de l'expression du gène *Oct4* (Avilion et al., 2003). Ces travaux révèlent que le trio de facteurs de transcription Oct4, Nanog et Sox2 maintient la pluripotence *in vivo*.

Dans les cellules précurseurs du TE, la voie Hippo est inactive. La protéine Yap (Yes-associated protein 1) est transloquée dans le noyau et interagit avec Tead4 (TEA-domain protein 4) pour transcrire *Cdx2* (Nishioka et al., 2009). En effet, les embryons *Tead4* *-/-* ne

forment pas de TE et montrent une diminution d'expression de *Cdx2* (Nishioka et al., 2008). *Cdx2* inhibe l'expression des régulateurs de pluripotence, *Pou5f1* et *Nanog* (Figure 2A) (Niwa et al., 2005; Strumpf et al., 2005).

Dans les cellules précurseurs de l'ICM, les contacts cellule-cellule activent la voie Hippo. La voie Hippo induit la phosphorylation de Yap qui ne peut pas être transloquée dans le noyau. Tead4 n'est plus actif et n'induit pas la transcription du régulateur de l'identité en TE, *Cdx2*. *Nanog* et *Pou5f1* ne sont pas inhibés par *Cdx2*. Grâce à l'activation de la voie Hippo dans les cellules de l'ICM, *Nanog* et *Oct4* maintiennent la pluripotence (Figure 2A) (Nishioka et al., 2009).

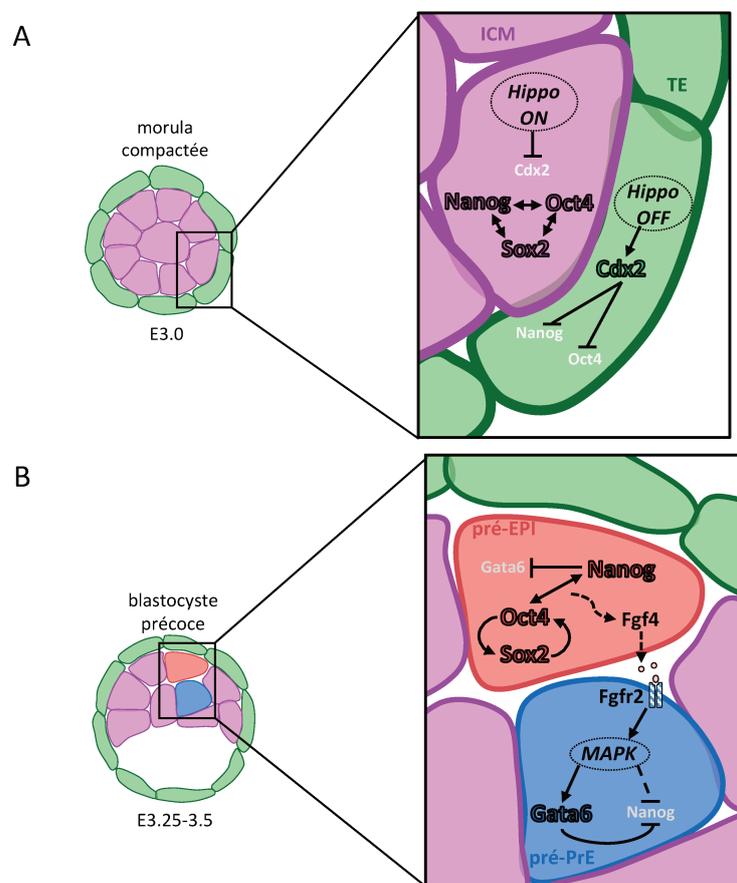


Figure 2 : Mécanismes moléculaires impliqués dans l'émergence des cellules de la masse cellulaire interne (ICM) puis des cellules de l'épiblaste (EPI) chez la souris.

A) Régulation moléculaire de l'identité des cellules de TE et ICM lors de la première ségrégation de lignage au stade morula compacté (E3.0). **B)** Régulation moléculaire de l'identité PrE et EPI des cellules de l'ICM lors de la seconde ségrégation de lignage au stade blastocyste précoce (E3.25-3.5).

Les pointes de flèches triangulaires représentent les activations et les pointes de flèches plates représentent les mécanismes d'inhibitions. Les traits pleins reflètent les interactions directes et les traits pointillés reflètent les interactions indirectes.

1.1.3. Seconde ségrégation de lignage : apparition de l'épiblaste

La seconde ségrégation de lignage est la deuxième étape de différenciation de l'embryon précoce. Une première sous-population de cellules de l'ICM se différencie en PrE, lignage extra-embryonnaire. La seconde sous-population de cellules de l'ICM reste pluripotente et forme l'EPI, à l'origine de l'embryon lui-même.

Avant spécification, à E3.0, les cellules de l'ICM co-expriment *Nanog*, marqueur de l'EPI, et *Gata6*, marqueur du PrE (Chazaud et al., 2006; Plusa et al., 2008). À E3.25, les cellules de l'ICM expriment de manière hétérogène *Gata6* et *Nanog*. Le destin des cellules de l'ICM exprimant plus fortement *Gata6* est alors orienté vers la différenciation en PrE. Inversement, le destin des cellules de l'ICM exprimant majoritairement *Nanog* est orienté vers la spécification en cellules pluripotentes de l'EPI. À E3.5, l'ICM est composé de cellules exprimant soit *Gata6* soit *Nanog* de manière exclusive (Chazaud et al., 2006; Plusa et al., 2008).

L'expression de *Gata6* est essentielle à la différenciation des cellules de l'ICM en PrE. De ce fait, l'inactivation du gène *Gata6* dans l'embryon empêche le développement du PrE et toutes les cellules maintiennent une expression de *Nanog* (Schrode et al., 2014). Ceci suggère également une inhibition de *Nanog* par *Gata6* dans les cellules de l'ICM se différenciant en PrE (Figure 2B). Au contraire, l'inactivation du gène *Nanog* dans l'embryon est suffisante pour induire la différenciation des cellules de l'ICM en PrE (Frankenberg et al., 2011). En effet, *Nanog* réprime directement l'expression de *Gata6*, en se liant à son promoteur, pour maintenir la pluripotence (Figure 2B) (Singh et al., 2007).

La spécification en PrE implique également la voie de signalisation *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK). Elle est activée par le *Fibroblast Growth Factor* (*Fgf*) 4, lui-même sécrété par les cellules de l'EPI, dans les cellules de PrE exprimant le récepteur FGFR2 (Kurimoto, 2006; Guo et al., 2010). De ce fait, après inactivation du gène *Fgf4*, la différenciation en PrE est inhibée dans les cellules de l'ICM exprimant le récepteur *Fgfr2*. On observe le même phénotype après blocage de la voie MAPK (Kang et al., 2013; Yamanaka et al., 2010; Chazaud et al., 2006; Arman et al., 1998). Au contraire, un excès de *Fgf4* induit la différenciation des cellules de l'ICM en PrE (Yamanaka et al., 2010). De plus, la voie FGF/MAPK agit en amont de *Gata6*. De ce fait, l'absence de PrE dans les embryons *Gata6*^{-/-} n'est pas inhibée par un traitement au *Fgf4* (Schrode et al., 2014). L'inhibition de la voie FGF/MAPK dans des embryons *Gata6*^{-/-} induit une augmentation de l'expression de *Nanog* suggérant une répression directe de *Nanog* par la voie FGF/MAPK (Schrode et al., 2014.). Ces travaux démontrent que la voie FGF/MAPK, activée par les futures cellules de l'EPI, agit en amont de *Gata6* pour induire la différenciation en PrE des cellules de l'ICM (Figure 2B).

1.1.4. Pluripotence *in vivo* et production de chimères

Les termes totipotence et pluripotence sont construits autour du terme latin *potens* faisant référence à la potentialité. Ces termes renvoient au potentiel développemental d'une cellule, c'est-à-dire à sa capacité à se différencier de manière plus ou moins limitée. Le test fonctionnel le plus utilisé pour connaître ce potentiel développemental est la formation de chimère. Une chimère est un organisme composé de cellules issues d'au moins deux zygotes différents (McLaren, 1976). Il existe deux sous-types de chimères : les chimères embryonnaires/primaires, appelées également chimères systémiques, et les chimères secondaires. Les chimères secondaires, que nous n'aborderons pas dans ce travail, sont composées de cellules provenant d'organismes adultes ou d'embryons post-organogénèse. Les chimères embryonnaires, que nous traiterons ici sous le terme chimère, correspondent aux chimères produites à partir de cellules d'embryons avant l'organogénèse (McLaren, 1976).

1.1.4.1. Chimères intraspécifiques chez la souris

Les premières chimères ont été obtenues dans les années 60 par Tarkowski chez la souris. Dans ses travaux, il a décrit la première méthode basée sur l'agrégation d'embryons pour obtenir des chimères (Figure 3) (Tarkowski, 1961). L'agrégation de deux embryons au stade 8-cellules (E2.5) a conduit au développement d'un blastocyste unique. Le transfert de ce blastocyste dans une souris pseudo-gestante a permis la naissance de nouveau-nés chimériques (Tarkowski, 1961; Mintz, 1965; McLaren and Bowman, 1969). Ces travaux valident le potentiel développemental des cellules de la morula à produire un embryon complet et démontrent ainsi leur totipotence (Tableau 1). L'agrégation d'ICM de souris à E3.5-4.0 à des morula à E2.5 a également produit des blastocystes chimériques (Rossant, 1975; Rossant and Lis, 1979). Les cellules de l'ICM, qui sont pluripotentes, ne contribuent pas à la formation du TE du blastocyste chimérique. En revanche, les cellules de la morula, qui sont totipotentes, participent à la formation du TE (Rossant, 1975; Rossant and Lis, 1979). De plus, l'agrégation d'ICM ne permet pas la production de blastocyste car les ICM n'ont pas la capacité de former du TE (Tableau 1) (Rossant and Lis, 1979).

En 1968, Gardner a décrit une seconde technique permettant la production de chimères chez la souris basée sur l'injection de cellules dans la cavité blastocoelique (Figure 3). L'injection de cellules issues d'ICM de souris à E3.5 dans la cavité blastocoelique d'embryons de souris au même stade a produit des blastocystes chimériques. Après transfert dans l'utérus d'une mère porteuse, ces blastocystes ont donné naissance à des souriceaux chimériques (Gardner, 1968). Après injection de cellules d'EPI d'embryons de souris à E4.0-

5.0 dans un blastocyste de souris, le fœtus entier était chimérique. A ce stade les cellules de l'EPI ont un potentiel développemental leur permettant de contribuer à tous les tissus du fœtus, caractéristiques de cellules pluripotentes (Tableau 1). Au contraire, après injection de cellules de PrE d'embryons de souris à E4.0-5.0 dans un blastocyste de souris, seul l'endoderme extra-embryonnaire était chimérique. Ceci montre que le potentiel développemental des cellules de PrE est restreint au PrE et ses dérivés (Tableau 1) (Gardner and Rossant, 1979). L'injection de cellules d'EPI d'embryons post-implantatoires de souris (E6.5) dans l'EPI d'embryons de souris au même stade a également induit la formation de chimères dans les tissus dérivés des cellules de l'EPI (Tam and Zhou, 1996).

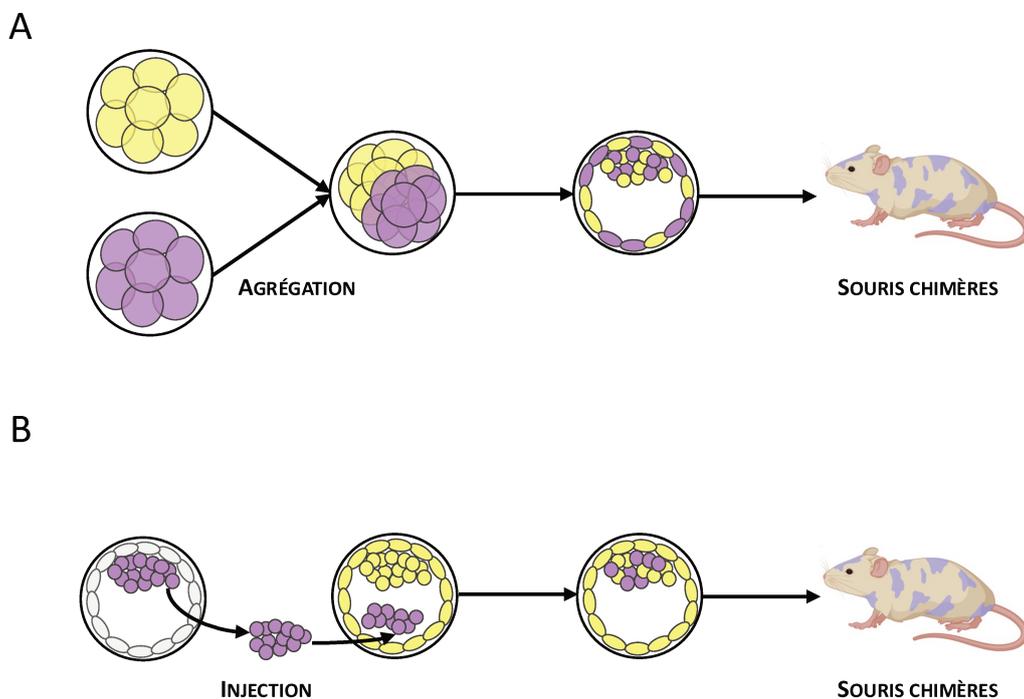


Figure 3 : Méthodes expérimentales pour la formation de chimères.

A) Chimères d'agrégation : agrégation dans la même zone pellucide de deux embryons *in toto* du stade 4-cellules au stade morula. Les cellules des deux embryons contribuent à la masse cellulaire interne (ICM) et au trophoctoderme (TE). **B)** Chimères d'injection : injection de l'ICM d'un blastocyste donneur dans un second blastocyste hôte. Les cellules donneuses contribuent uniquement à l'ICM.

	Totipotence	Pluripotence		PrE
	Blastomères	ICM	EPI	
3 feuillets embryonnaires	X	X	X	-
PrE	X	X	-	X
TE	X	-	-	-

Tableau 1 : Potentiel développemental des cellules *in vivo* chez la souris.

Les croix vertes correspondent à la capacité des lignées cellulaires (colonnes) à se différencier dans le lignage énoncé dans les lignes.

1.1.4.2. Chimères interspécifiques chez les rongeurs

La production de chimère n'est pas une caractéristique unique à l'embryon précoce de souris. En effet, dès les années 70, différents travaux d'agrégation de morulas de rat (*Rattus norvegicus*) avec des morula de souris (*Mus musculus*) ont montré qu'il était possible d'obtenir des blastocystes chimériques rat/souris *in vitro* (Mulnard, 1973; Zeilmaker, 1973). L'agrégation de morulas de campagnol roussâtre (*Clethrionomys glareol*) et de souris permettait également la formation de blastocystes chimériques (Mystkowska, 1975). Ces premiers travaux démontrent qu'il était possible d'obtenir des blastocystes chimériques à partir de morula de deux espèces différentes. L'injection d'ICM de rat dans des blastocystes de souris, ou l'agrégation d'ICM de rat avec des morulas de souris, permet également la production de chimères interspécifiques dans lesquelles le TE est issu de cellules de souris (Gardner and Johnson, 1973; Rossant, 1976). En 1980, J. Rossant a produit le premier nouveau-né chimérique après l'injection de cellules d'ICM de souris *Mus caroli* dans un blastocyste de souris *Mus musculus*. Ces travaux démontrent que la formation de chimères pré- et post-implantatoires sont possible entre deux espèces de rongeurs différentes.

De plus, il a été montré que la production de chimères post-implantatoires n'est possible que lorsque l'espèce de mammifère, dont sont issus les cellules du TE, est la même que celle de la mère porteuse (Rossant et al., 1983; Fehilly et al., 1984). Dans le cas contraire, à cause de la différence d'espèce entre les cellules de TE et les cellules utérines de la mère porteuse, les embryons chimériques ne s'implantent pas (Rossant et al., 1983; Fehilly et al., 1984).

La production de chimères est possible de manière intra- ou inter-spécifique grâce aux méthodes d'agrégation d'embryons ou d'injection de cellules dans un embryon. C'est un outil puissant pour connaître le potentiel développemental des cellules et pour étudier le développement précoce.

1.2. Le primate comme objectif final

1.2.1. Le développement embryonnaire précoce chez les primates

Le développement embryonnaire chez l'humain (*Homo sapiens*) suit les mêmes étapes que celui de la souris. Cependant il existe des différences dans la chronologie de certaines étapes, des mécanismes mis en œuvre ainsi que des structures mises en place (Figure 4) (Rossant, 2024; Niakan et al., 2012).

Après trois divisions successives, le zygote atteint le stade 8 cellules à E3.0 (Shahbazi, 2020). Contrairement à la souris où l'EGA survient au stade 2-cellules, l'EGA dans l'embryon humain a lieu au stade 8-cellules (Figure 4) (Vassena et al., 2011). La ségrégation ICM/TE a lieu à E5.0 et fait émerger les cellules pluripotentes de l'ICM (Figure 4) (Niakan and Eggan, 2013; Petropoulos et al., 2016; Meistermann et al., 2021). Comme chez la souris, les cellules de l'ICM expriment OCT4, SOX2 et NANOG et les cellules de TE expriment CDX2 et YAP1 (Cauffman et al., 2009; Niakan and Eggan, 2013; Noli et al., 2015). Contrairement au modèle murin, CDX2 n'est pas détectable avant la cavitation de l'embryon humain (Niakan and Eggan, 2013). En revanche, de manière similaire à la souris, la polarisation des cellules externes de la morula humaine maintient inactive la voie Hippo (Gerri et al., 2020a; Zhu et al., 2021). TEAD4 et YAP1 sont alors transloqués dans le noyau pour activer l'expression de gènes associé à l'identité en TE tel que GATA3 (Gerri et al., 2020a; Zhu et al., 2021). Entre E6.0 et E7.0, l'ICM se différencie en EPI et en PrE (Figure 4) (Niakan and Eggan, 2013; Stirparo et al., 2018; Meistermann et al., 2021). Comme chez la souris, les cellules pluripotentes de l'EPI expriment exclusivement NANOG et les cellules de PrE expriment exclusivement GATA6 (Roode et al., 2012). De plus, la formation du PrE dépend également de la voie FGF/MAPK (Dattani et al., 2024). Entre E7.0 et E10.0, l'embryon s'implante (Figure 4) (Gerri et al., 2020b). L'EPI s'épithélialise et prend une forme de disque, contrairement à l'EPI de l'ovo-cylindre murin (Shahbazi, 2020). Enfin, à E14.0, la gastrulation débute et les cellules de l'EPI initient leur sortie de la pluripotence (Figure 4) (Ghimire et al., 2021).

À cause des différences entre espèces, l'étude du développement embryonnaire précoce chez l'Homme est nécessaire pour élucider les mécanismes régulant les étapes précoces du développement pour améliorer les techniques de procréation médicalement assistée, la compréhension de l'organogenèse et de l'origine de maladies génétiques (Rossant, 2024). Cependant, l'accès et l'utilisation d'embryons humains est très réglementée. Seul les embryons produit dans un but médical peuvent être donnés à la recherche par les couples concernés (Rossant, 2024). De plus, leur culture *in vitro* est limitée à 14 jours (Rossant, 2024).

Ainsi, les embryons humains sont rares, mais des modèles alternatifs existent chez les primates non-humains (Boroviak and Nichols, 2017).

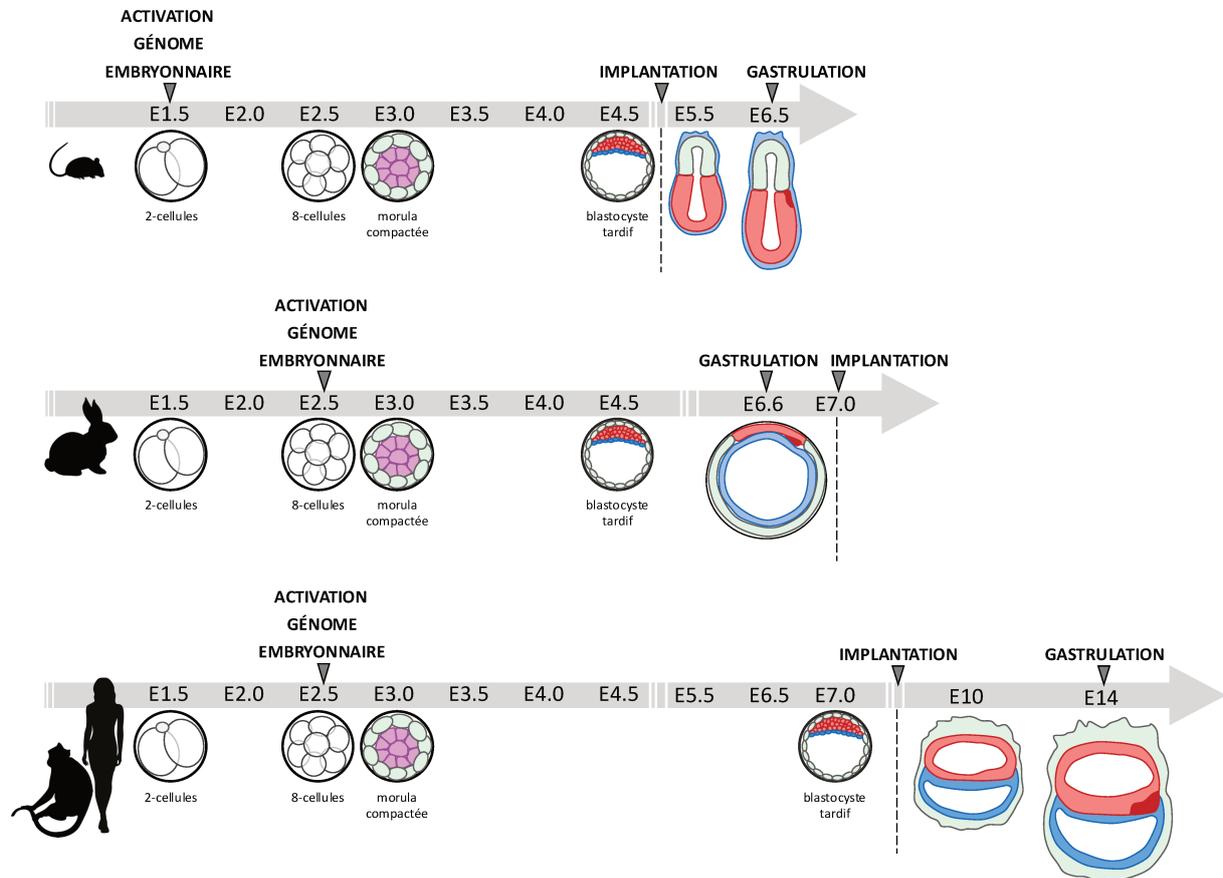


Figure 4 : Développement embryonnaire précoce des primates, lapin et souris.

Comparaison de la cinétique de développement embryonnaire pré- et péri-implantatoire chez les rongeurs, le lapin et les primates. Les triangles gris indiquent les évènements clés du développement embryonnaire.

1.2.2. Chimères *in vivo* chez les primates

En 2012, Tachibana *et al.* ont montré qu'il est possible de produire des chimères chez le macaque rhésus (*Macaca mulatta*). En effet, leurs expériences d'agrégation d'embryons 4-cellules donne des embryons pré-implantatoire chimériques dont l'ICM ainsi que le TE sont composés de cellules issues de différents embryons (Tachibana *et al.*, 2012). De ce fait, chez le primate, les cellules d'embryons 4-cellules sont totipotentes car elles peuvent se différencier en cellules de TE et d'ICM. Après transfert dans une mère porteuse, ces embryons chimériques ont produit des fœtus et des nouveau-nés viables (Tachibana *et al.*, 2012).

L'analyse des *loci* de microsatellites a montré différents géotypes au sein de chaque fœtus et nouveau-nés, confirmant le chimérisme (Tachibana et al., 2012).

A l'inverse, leurs expériences d'injection d'ICM dans un blastocyste hôte ne produit pas de chimère (Tachibana et al., 2012). En effet, dans de rare cas, les ICM de l'hôte et injectées se sont développées séparément donnant deux fœtus distincts (Tachibana et al., 2012). Les fœtus issus d'ICM injectés se sont développés dans le TE de l'embryon hôte, suggérant que l'ICM n'a plus la capacité à se différencier en TE (Tachibana et al., 2012). L'incapacité de l'ICM, après injection dans un blastocyste hôte, à produire des chimères comme chez le rongeur suggère qu'il existe des différences entre les rongeurs et les primates (Tachibana et al., 2012). En effet, contrairement à l'embryon de souris, les cellules de l'ICM dans le blastocyste précoce de primate sont déjà séparées en une sous-population de cellules EPI exprimant NANOG et, en une sous-population de cellules PrE exprimant GATA6 (Tachibana et al., 2012). Selon les auteurs cette hétérogénéité dans l'embryon hôte le rendrait moins permissif à l'incorporation de cellules étrangères et expliquerait l'incapacité de produire des chimères par injection d'ICM (Tachibana et al., 2012).

1.3. L'embryon de lapin comme modèle alternatif

1.3.1. Le développement embryonnaire précoce chez le lapin

En dehors des rongeurs, le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) est le mammifère le plus utilisé comme modèle en laboratoire (Fischer et al., 2012). Grâce à sa petite taille, le lapin est facile à manipuler. De plus, il présente de nombreux avantages pour l'étude du développement (Madeja et al., 2019). En effet, son temps de gestation est court (~ 30 jours) et la production programmée d'embryons en grande quantité est facilitée par la super-ovulation très efficace, en réponse aux stimulations hormonales (Madeja et al., 2019). La programmation de l'ovulation est possible car elle survient au moment du coït (Madeja et al., 2019). De plus, les embryons précoces de lapin peuvent être cultivés jusqu'à E5.0 *in vitro* (Jin et al., 2000).

Les grandes étapes du développement sont les mêmes que chez la souris et le primate (Figure 4). En revanche, la cinétique d'apparition de ces étapes et les mécanismes mis en œuvre sont plus proches de ce qui se passe chez le primate. Ceci fait du lapin un modèle alternatif intéressant pour l'étude du développement précoce chez le primate. Après trois divisions successives, à E1.5, le zygote atteint le stade 8-cellules où survient l'EGA, contrairement au modèle murin où l'EGA a lieu au stade 2-cellules (Figure 4) (Christians et al., 1994). L'embryon de lapin atteint le stade de morula compactée à E3.0 et débute alors la

ségrégation ICM/TE (Figure 4) (Afanassieff et al., 2020; Bouchereau et al., 2022). A E3.5, le TE et l'ICM sont spécifiés, l'embryon est alors un blastocyste précoce composé de cellules pluripotentes de l'ICM et de cellules de TE (Figure 4) (Afanassieff et al., 2020; Bouchereau et al., 2022). Puis, entre E4.0 et E5.0, a lieu la ségrégation EPI/PE menant à l'émergence des cellules pluripotentes de l'EPI (Figure 4) (Bouchereau et al., 2022). A E5.0 survient l'inactivation du chromosome X, dont le mécanisme est proche de celui du primate (Okamoto et al., 2011). Puis, à E6.25, la gastrulation débute et marque la sortie de la pluripotence des cellules de l'EPI (Figure 4) (Kobayashi et al., 2021; Bouchereau et al., 2022). Comme chez le primate, l'EPI de l'embryon à E6.0 forme un disque bilaminaire (Viebahn et al., 2002). Contrairement aux rongeurs et aux primates, l'embryon s'implante après le début de la gastrulation (entre E6.5 et E7.0) (Sivaraman et al., 2008). Il est alors facilement accessible, ce qui facilite l'étude de la gastrulation (Fischer et al., 2012).

1.3.2. Chimères *in vivo* chez le lapin

La production de chimères est possible chez le lapin. Dans les années 70, des travaux d'injections d'ICM d'embryons de lapin à E4.0 dans des blastocystes de lapin au même stade ont permis de produire des lapins nouveau-nés chimériques viables (Gardner and Munro, 1974; Babinet and Bordenave, 1980). Les embryons donneurs d'ICM avaient un allotype pour les chaînes d'immunoglobuline différents de celui des embryons hôtes (Gardner and Munro, 1974; Babinet and Bordenave, 1980). Ainsi, le chimérisme a été confirmé en caractérisant l'allotype des nouveau-nés (Gardner and Munro, 1974; Babinet and Bordenave, 1980). En 1988, Yang et Foote obtiennent des lapins chimériques viables après l'injections de cellules d'une morula de lapin dans une seconde morula de lapin (Yang and Foote, 1988). Enfin, en 2004, Bodó *et al.* ont produit des lapins chimères en injectant un unique blastomère issu d'un embryon 8-cellules dans un second embryon au stade 16-cellules. Le blastomère injecté contenait un transgène (Bodó et al., 2004). Des amplifications par PCR de ce transgène réalisé sur différents organes des nouveau-nés ont défini les individus chimères (Bodó et al., 2004). Bodó *et al.* ont montré que le blastomère avait contribué à la formation d'organes issus des trois feuillets embryonnaires ainsi qu'à la lignée germinale (Bodó et al., 2004). Ainsi, il est possible d'obtenir des chimères chez le lapin en injectant des ICM ou des blastomères dans des embryons hôtes du stade 8-cellules à blastocyste.

2. Lignées de cellules souches pluripotentes

Il est possible de capturer la pluripotence *in vitro* grâce aux cellules souches pluripotentes (*Pluripotent Stem Cells* ou *PSC*), dérivées à partir d'embryons, ou reprogrammées à partir de cellules différenciées. Les *PSC* présentent deux caractéristiques : la pluripotence et l'auto-renouvellement. La pluripotence signifie la capacité à se différencier dans tous les feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) et, *in fine*, dans toutes les cellules formant un organisme adulte (cellules de la lignée germinales incluses). L'auto-renouvellement définit la capacité d'une cellule à se multiplier indéfiniment sans modification de ses caractéristiques génétiques et phénotypiques. Ainsi, dans le cas des *PSC*, les cellules conservent leur pluri-potentialité au cours des générations cellulaires et ce pendant des mois, voire des années en culture.

2.1. Chez la souris

2.1.1. Capture de la pluripotence *in vitro*

2.1.1.1. Cellules souches pluripotentes issues d'embryons pré-implantatoires

Les cellules souches embryonnaires (*Embryonic Stem Cells* ou *ESC*) sont obtenues à partir de l'ICM des embryons de souris à E3.5 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Ying et al., 2008). Elles sont cultivées en présence de *Leukemia Inhibitory Factor* (*LIF*), lequel les maintient dans un état indifférencié, et de deux molécules chimiques inhibitrices de kinases (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988; Ying et al., 2008). La première molécule, PD0325901, inhibe la *Map/Erk Kinase* (*Mek*) et bloque ainsi la transduction du signal transduit par l'*Extracellular signal-Regulated Kinase* (*Erk*) empêchant ainsi l'engagement dans la différenciation. PD0325901 renforce l'auto-renouvellement des *ESC* (Burdon et al., 1999; Ying et al., 2008). La seconde molécule, CHIR99021, active la voie canonique *Wnt* en inhibant la *Glycogen Synthase Kinase* (*Gsk*) 3. Elle améliore la survie des *ESC* et renforce leur auto-renouvellement (Ying et al., 2008; Wray et al., 2011). Il est possible de cultiver les *ESC* dans un milieu sans sérum et ne contenant que ces deux molécules (appelé 2i). Cependant, la supplémentation du milieu par le *LIF* améliore l'auto-renouvellement. En particulier, le *LIF* augmente la clonogénicité des cellules c'est-à-dire leur capacité à former une colonie à partir d'une cellule unique (Wray et al., 2011). Les *ESC* cultivées dans le milieu 2i/*LIF* expriment de manière homogène les gènes associés à la pluripotence comme *Klf4*, *Rex1* ou *Nanog* et expriment peu les gènes associés à la différenciation précoce (Marks et al., 2012). Le transcriptome des *ESC* 2i/*LIF* est très proche

de celui de l'EPI pluripotent à E4.5 (Boroviak et al., 2014; Nakamura et al., 2016; Kinoshita et al., 2021). Comme les cellules de l'EPI pré-implantatoire, les ESC 2i/LIF sont dans l'état naïf de pluripotence. Elles sont totalement non-spécifiées (Figure 5) (Nichols and Smith, 2009; Boroviak et al., 2014).

Il est également possible de cultiver les ESC dans un milieu composé de LIF et de sérum de veau foetal (LIF/FCS). Historiquement, cette condition de culture a été celle utilisée pour obtenir et cultiver les premières lignées de ESC. Elle est toujours largement utilisée à cause de sa simplicité et de son faible coût. La contrepartie est une culture plus hétérogène que les ESC 2i/LIF. En effet, une sous-population de cellules exprime des gènes associés à la différenciation comme *Brachyury*, *Eomes*, *Fgf5* ou *Gbx2* (Toyooka et al., 2008; Hayashi et al., 2008). La purification de cette sous-population puis sa remise culture en milieu LIF/FCS redonne une population hétérogène avec l'émergence de cellules exprimant des marqueurs de différenciation (Toyooka et al., 2008; Hayashi et al., 2008). Cette observation suggère que les ESC LIF/FCS sont dans un état instable de pluripotence et dérivent spontanément vers un engagement dans la différenciation (Marks et al., 2012). Les cellules ESC LIF/FCS ont, comme les ESC 2i/LIF, un transcriptome global proche de celui de l'EPI pré-implantatoire à E4.5 (Boroviak et al., 2014). Cependant, elles sont dans un état naïf de pluripotence plus instable que celui des ESC 2i/LIF (Figure 5) (Nichols and Smith, 2009).

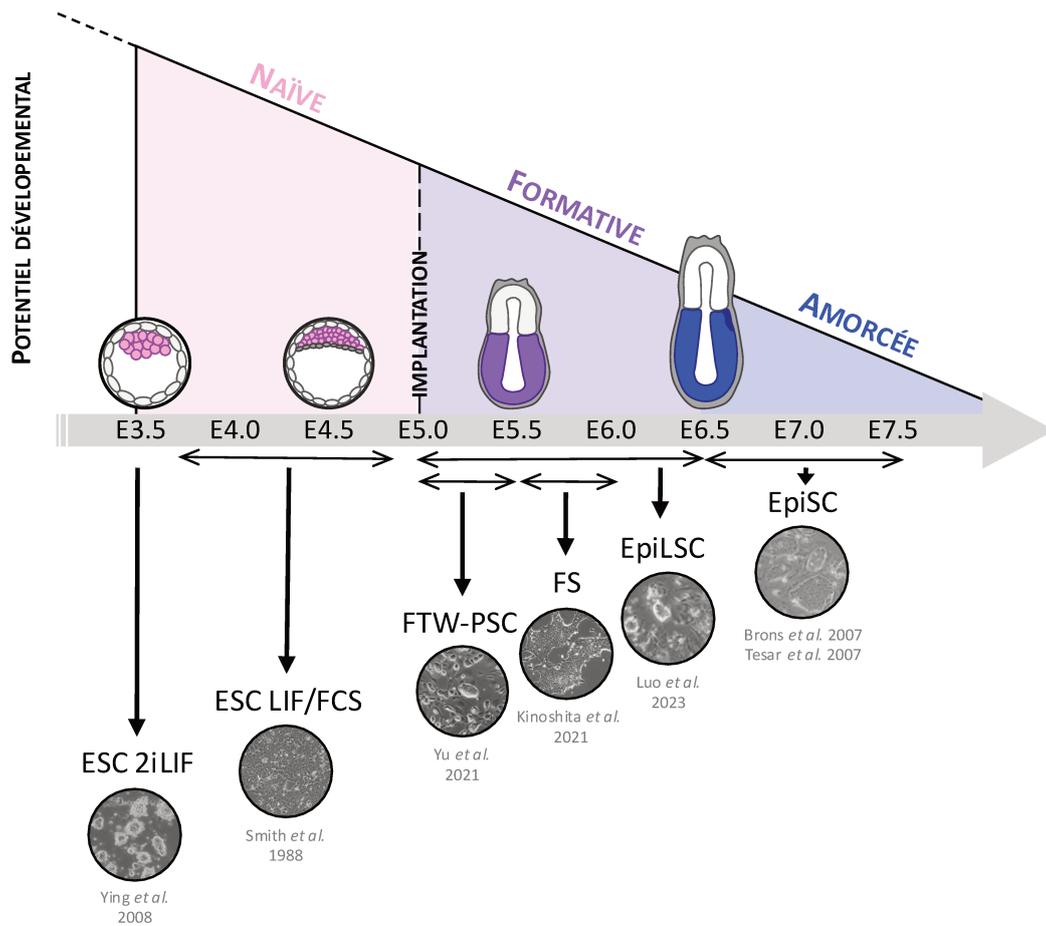


Figure 5 : Continuum de pluripotence – les PSC chez la souris et leurs équivalents développementaux.

Schéma représentant les différentes lignées de PSC chez la souris et les différents états de pluripotence *in vivo* (naïf, formatif et amorcé) en fonction du temps embryonnaire (axe horizontal : flèche grise) et du potentiel développemental (axe vertical).

2.1.1.2. Cellules souches pluripotentes issues d'embryons post-implantatoires

Bien que les cellules de l'EPI post-implantatoire soient toujours pluripotentes (Tam and Zhou, 1996), leur transcriptome est différent de celui de l'EPI pré-implantatoire (Boroviak et al., 2014). L'établissement de PSC à partir d'EPI d'embryons post-implantatoires (E5.5 à E7.5) est possible en présence de Fgf2 et d'activine A (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Osorno et al., 2012). Les cellules ainsi produites sont appelées *Epiblast Stem Cells* (EpiSC). Contrairement aux ESC, les EpiSC forment de larges colonies plates. Elles résistent peu à la dissociation unicellulaire ce qui rend leur culture plus délicate (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Les EpiSC s'auto-renouvellent, sont pluripotentes, et expriment les gènes associés à la

pluripotence *Oct4*, *Sox2* et *Nanog* (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Leur transcriptome est proche de celui des cellules de l'EPI post-implantatoire à E6.5-7.5 (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Kojima et al., 2014; Kinoshita et al., 2021). Les cellules de l'EPI post-implantatoire dès E6.5, comme les EpiSC, sont prêtes pour la différenciation : elles sont dans l'état amorcé de pluripotence (Figure 5) (Nichols and Smith, 2009; Boroviak et al., 2014; Tesar et al., 2007; Kinoshita et al., 2021).

2.1.1.3. Les cellules souches pluripotentes induites

L'obtention de PSC peut également se faire à partir de cellules différenciées en les reprogrammant vers la pluripotence. On les appelle alors cellules souches pluripotentes induites (*induced Pluripotent Stem Cells* ou iPSC). Dans un milieu de culture adapté, la surexpression conjointe des facteurs associés à la pluripotence *Oct4*, *Klf4*, *Sox2* et *cMyc* permet l'obtention d'iPSC à partir de fibroblastes murins (Takahashi and Yamanaka, 2006). Comme les PSC dérivées d'embryons, les iPSC sont pluripotentes et s'auto-renouvellent (Takahashi and Yamanaka, 2006). La reprogrammation en iPSC permet d'obtenir des PSC génétiquement identiques à l'organisme adulte dont elles sont issues (Takahashi and Yamanaka, 2006). Selon le milieu et les conditions utilisées pour les cultiver, les iPSCs peuvent s'auto-renouveler à l'état naïf, l'état formatif, ou l'état amorcé de pluripotence (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007).

2.1.2. Régulation de la pluripotence naïve et amorcée

2.1.2.1. Voies de signalisations régulant la pluripotence naïve et amorcée

La pluripotence naïve est promue par l'activation des voies LIF/STAT3, Wnt, BMP/SMAD et par l'inactivation de la voie FGF/MAPK. Le LIF active la voie LIF/STAT3 pour maintenir la pluripotence naïve et inhiber la différenciation en mésoderme et endoderme (Bourillot et al., 2009; Aksoy et al., 2014; Niwa et al., 1998; Ying et al., 2003). Le LIF se lie à son hétérodimère de récepteur qui induit l'activation par phosphorylation du facteur de transcription Stat3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) (Yoshida et al., 1994; Stahl et al., 1994; Niwa et al., 1998). Dans les ESC, Stat3 phosphorylé s'homodimérise et est alors transloqué dans le noyau pour transcrire des gènes soutenant l'auto-renouvellement et la pluripotence (Figure 6) (Boeuf et al., 1997; Niwa et al., 1998, 2009). Dans les ESC, le LIF active également la voie PI3K/AKT afin de stimuler la pluripotence et l'auto-renouvellement (Paling et al., 2004; Storm et al., 2007).

L'activation de la voie MAPK par le facteur de croissance Fgf4 est impliquée dans le différenciation en neurectoderme (Kunath et al., 2007). En effet, l'inhibition la voie FGF/MAPK dans les ESC de souris soutient l'auto-renouvellement et la pluripotence en inhibant la différenciation neurale (Figure 6) (Burdon et al., 1999; Ying et al., 2008).

L'activation de la voie canonique Wnt, mimée par l'inhibition de Gsk3, renforce l'auto-renouvellement et la pluripotence naïve (Ying et al., 2008; Wray et al., 2011). L'inhibition de Gsk3 stabilise la beta-caténine qui lie et inhibe le répresseur de pluripotence Tcf3 (Figure 6) (Clevers, 2006; Wray et al., 2011). En effet, la répression de *Tcf3*, comme l'inhibition de Gsk3, stimule l'auto-renouvellement et l'expression de gènes associés à la pluripotence comme *Oct4*, *Sox2* et *Nanog* (Cole et al., 2008; Wray et al., 2011; Pereira et al., 2006).

La pluripotence naïve est également soutenue par l'activation de la voie *Bone morphogenetic protein* (Bmp) 4/ *Suppressor of mothers against decapentaplegic* (Smad). Bmp4 lie son récepteur qui induit l'activation de Smad1. Le facteur de transcription Smad1 transcrit les facteurs *Inhibitor of differentiation* (Id) 1 et Id3 qui inhibent la différenciation neurale des ESC (Figure 6) (Ying et al., 2003).

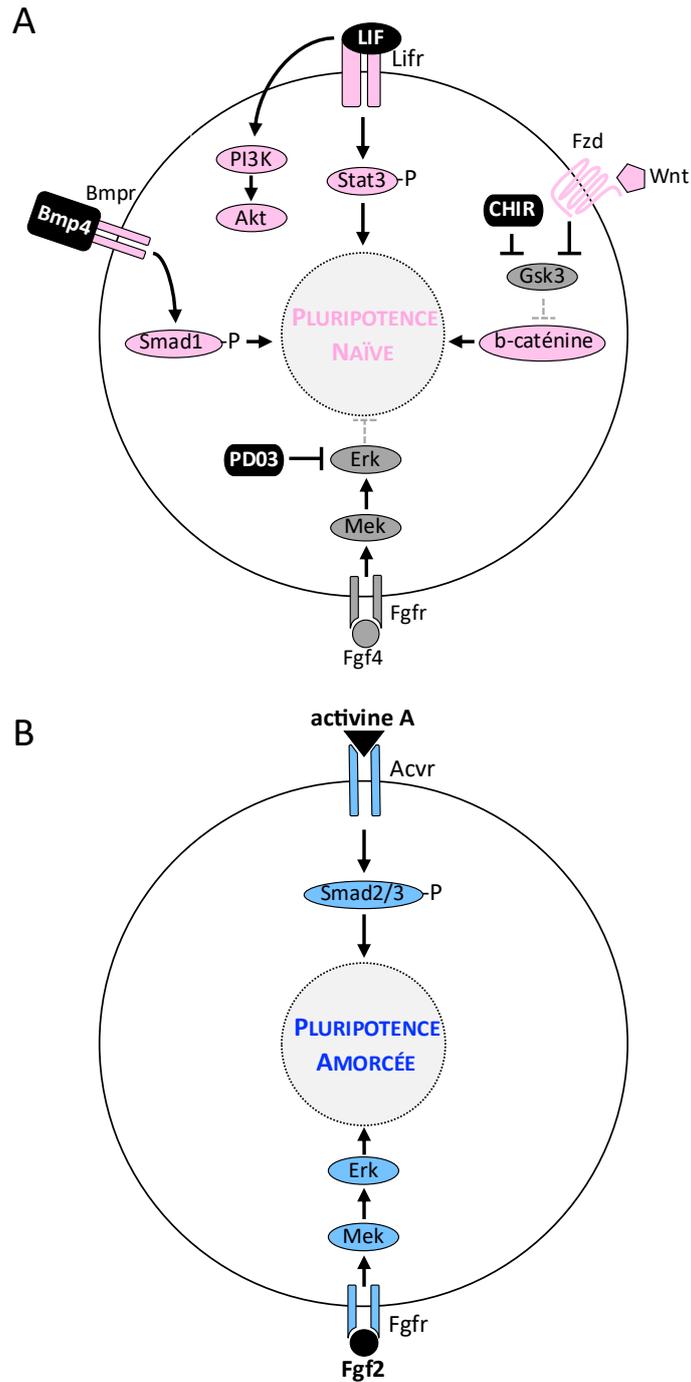


Figure 6 : Facteurs extrinsèques et voies de signalisation régulant la pluripotence naïve et amorcée chez la souris.

Schémas représentant les facteurs extrinsèques et voies de signalisation régulant la pluripotence **A)** naïve et **B)** amorcée chez la souris.

Les flèches noires représentent les activations. Les flèches dont la pointe est aplatie représentent les inhibitions. Les flèches grises représentent les activations et inhibitions contournées par les facteurs extrinsèques.

Contrairement à la pluripotence naïve, la pluripotence amorcée est stimulée par l'activation des voies de signalisation Nodal/Activine et FGF/MAPK. La voie Nodal/Activine est essentielle à l'établissement et à l'auto-renouvellement des EpiSC (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). En effet, la répression de cette voie engage la différenciation ectodermale (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Vallier et al., 2009; Liu et al., 2018). La voie Nodal/Activine est activée dans les EpiSC par l'effet paracrine de l'activine A sécrétée par les cellules nourricières en réponse au Fgf2 contenu dans le milieu (Greber et al., 2007). Cette voie est aussi activée par l'effet autocrine de Nodal, exprimé et sécrété par les EpiSC (Greber et al., 2010; Tesar et al., 2007; Liu et al., 2018). En réponse à l'activine A ou à Nodal, les hétérodimères Smad2/3 sont phosphorylés et induisent alors l'expression de gènes associés à la pluripotence comme *Nanog* (Figure 6) (Greber et al., 2010). Les EpiSC sont également dépendantes du Fgf2 (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). En effet, son absence rend la dérivation d'EpiSC à partir d'embryons post-implantatoires difficile (Figure 6) (Brons et al., 2007). Dans les EpiSC, le Fgf2 active la voie ERK pour inhiber la différenciation neurale des EpiSC (Yu et al., 2018; Greber et al., 2010).

2.1.2.2. Noyau de pluripotence

La pluripotence, naïve comme amorcée, est soutenue par les facteurs Oct4, Sox2 et *Nanog*, lesquels forment le noyau de pluripotence. Oct4 (codé par *Pou5f1*), Sox2 et *Nanog* sont exprimés dans les ESC et dans les EpiSC (Tesar et al., 2007; Brons et al., 2007; Masui et al., 2007; Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). La répression d'un de ces trois facteurs induit la différenciation et altère l'auto-renouvellement (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000; Ivanova et al., 2006; Masui et al., 2007; Mitsui et al., 2003). Les facteurs du noyau de pluripotence régulent mutuellement leur expression et s'auto-régulent (Figure 7) (Chew et al., 2005; Rodda et al., 2005; Loh et al., 2006). En effet, l'expression de *Nanog* est régulée par Sox2 et Oct4 qui se lient sur sa région cis-promotrice (Rodda et al., 2005). À son tour, *Nanog* régule l'expression de *Pou5f1* et Sox2 (Loh et al., 2006). De plus, Oct4 et Sox2 activent leur propre expression en liant les *enhancers* de *Pou5f1* et Sox2 (Masui et al., 2007; Chew et al., 2005).

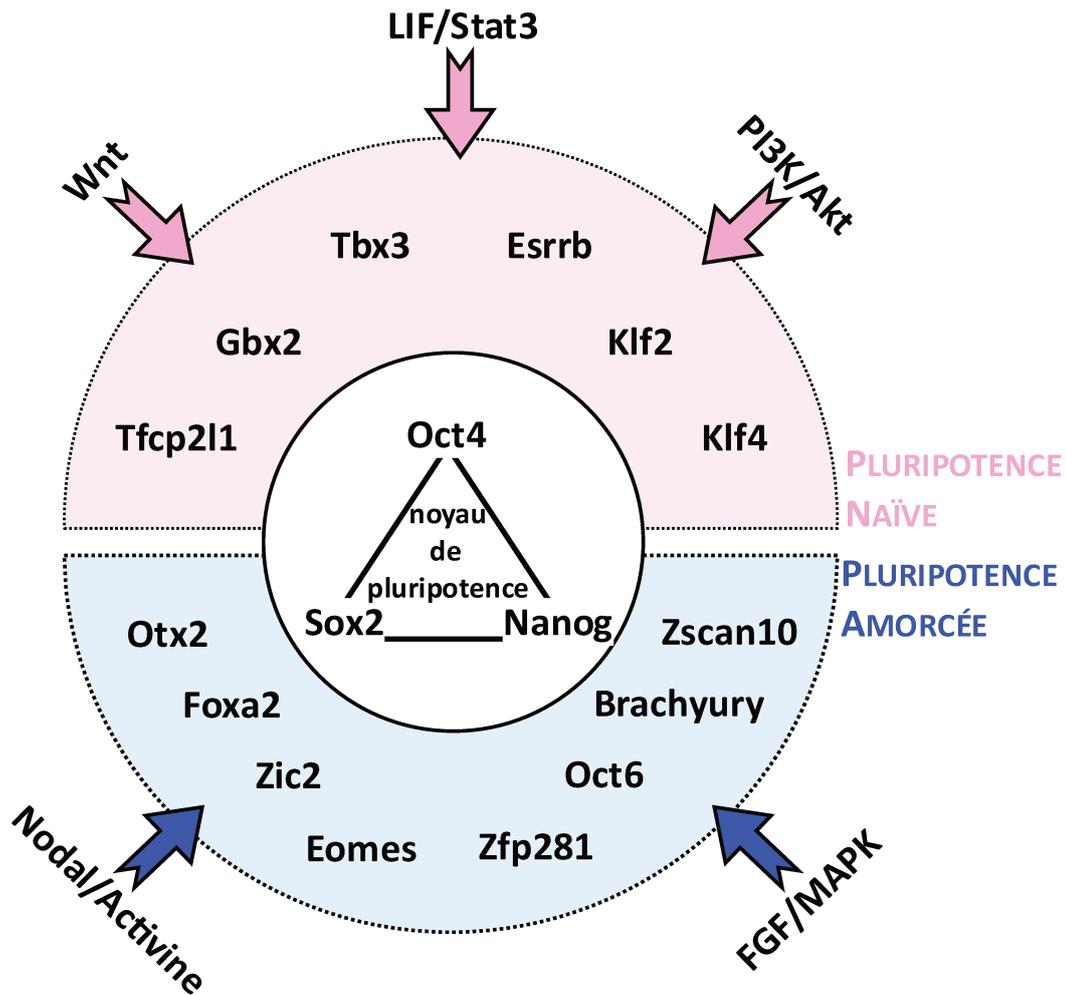


Figure 7 : Réseau de facteurs de transcription régulant la pluripotence chez la souris.

Schéma représentant les facteurs de transcription du noyau de pluripotence (au centre) et le réseau élargi de facteur de transcription régulant la pluripotence naïve (en rose) et amorcée (en bleu) ainsi que les voies de signalisation régulant positivement ces réseaux.

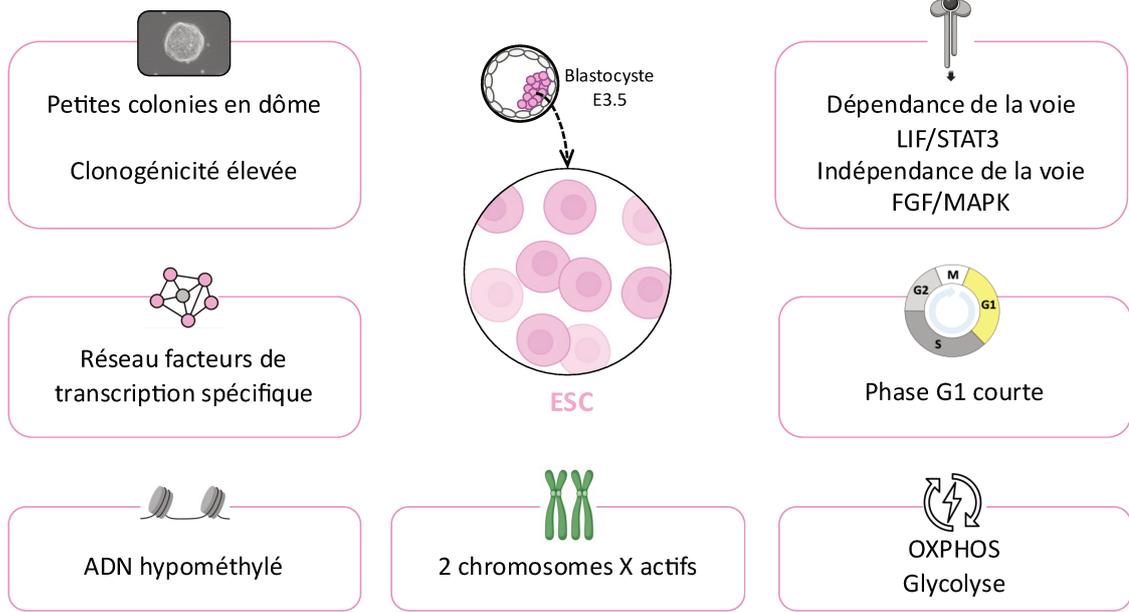
2.1.2.3. Réseaux de facteurs de transcription de pluripotence naïve et amorcée

Les ESC expriment des facteurs de transcription spécifiques de la pluripotence naïve tel que *Krüppel-like factor* (Klf) 2, 4 et 5 ; *Transcription factor CP2-like 1* (Tfc2l1) ; *Gastrulation brain homeobox* (Gbx) 2 ; *T-box transcription factor* (Tbx) 3 ; et *Estrogen-related receptor beta* (Esrrb) (Figure 8) (Jiang et al., 2008; Bourillot et al., 2009; Guo et al., 2009; Kalkan et al., 2017; Tai and Ying, 2013; Liu et al., 2018). Ces facteurs de transcription sont des cibles des voies LIF/STAT3, Wnt, PI3K/AKT et MAPK, impliquées dans le maintien la pluripotence naïve (Bourillot et al., 2009; Martello et al., 2013; Tai and Ying, 2013; Niwa et al., 2009; Storm et al.,

2009; Yeo et al., 2014; Martello et al., 2012). Dans les ESC, la surexpression des facteurs de transcription associés à la pluripotence naïve inhibe la différenciation (Hall et al., 2009; Aksoy et al., 2014; Yeo et al., 2014; Tai and Ying, 2013; Martello et al., 2013; Niwa et al., 2009; Martello et al., 2012). À l'inverse, leur inhibition altère la pluripotence naïve et l'auto-renouvellement des ESC (Jiang et al., 2008; Yeo et al., 2014; Ivanova et al., 2006). Ces facteurs de transcription créent un réseau en interagissant entre eux et avec le noyau de pluripotence pour stimuler la pluripotence naïve (Figure 7). En effet, les facteurs de transcriptions Klf2, Klf4, et Klf5 se lient aux régions promotrices de gènes associés à la pluripotence tel que *Nanog*, *Sox2*, *Pou5f1* et *Esrrb* (Jiang et al., 2008). De plus, *Esrrb* interagit avec Oct4 pour transcrire *Nanog* et *Gbx2* et induit l'expression de *Klf4* (Van Den Berg et al., 2008; Wang et al., 2017).

Dans les EpiSC, l'expression des facteurs de transcriptions associés à la pluripotence naïve diminue (Tesar et al., 2007; Buecker et al., 2014; Liu et al., 2018). Les EpiSC expriment au contraire des facteurs de transcriptions associés à la différenciation, comme *Brachyury*, *Eomesodermin* (*Eomes*), *Gata6*, *Sox17* et *Forkhead Box A2* (*Foxa2*) sans pour autant se différencier (Figure 8) (Tesar et al., 2007; Liu et al., 2018). Durant la transition de l'état naïf vers l'état amorcé de pluripotence, Oct4 interagit avec de nouveaux partenaires comme *Orthodenticle Homeobox 2* (*Otx2*), *Zic Family Member 2* (*Zic2*), *Zinc Finger Protein 281* (*Zfp281*), Oct6 (ce dernier codé par *Pou3f1*) et *Zinc Finger And SCAN Domain Containing 10* (*Zscan10*) (Figure 7) (Buecker et al., 2014). Oct4 est alors relocalisé sur les *enhancers* de gènes spécifiques de l'EPI post-implantatoire tel que *Fgf5* (Buecker et al., 2014). *Otx2* est un facteur majeur de l'acquisition de la pluripotence amorcée. Son inhibition empêche la conversion des ESC vers l'état amorcé de pluripotence (Acampora et al., 2013; Buecker et al., 2014).

A



B

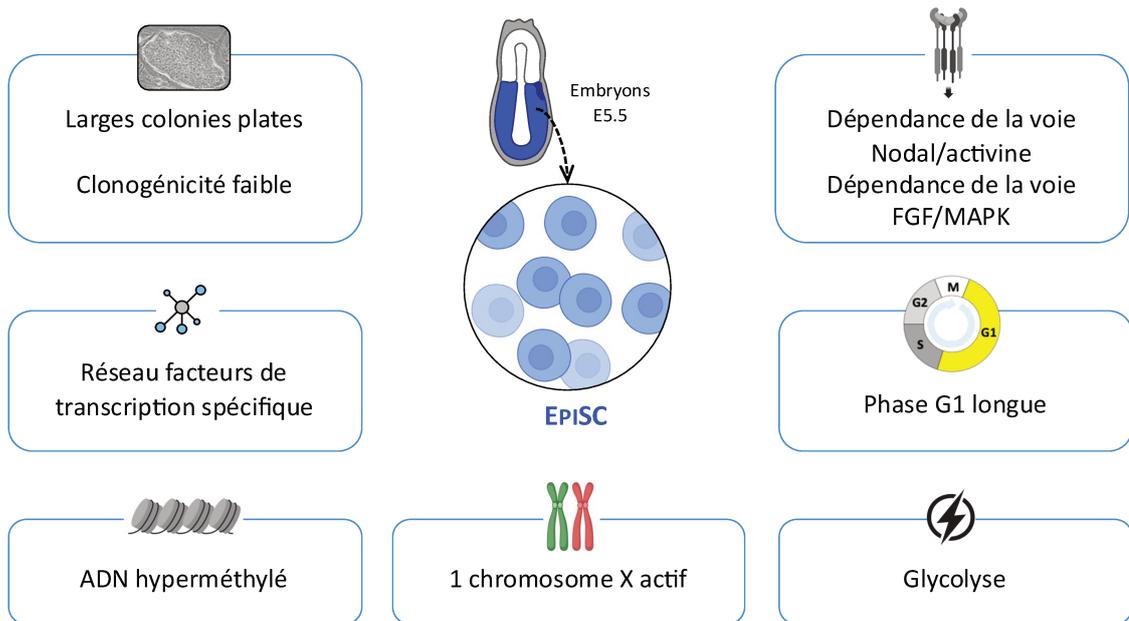


Figure 8 : Caractéristiques de la pluripotence naïve et la pluripotence amorcée chez la souris.

A) Caractéristiques principales de la pluripotence naïve et des cellules souches embryonnaire (ESC) chez la souris.

B) Caractéristiques principales de la pluripotence amorcée et des EpiSC chez la souris.

2.1.2.4. Métabolisme

Dans une cellule, la production d'énergie par la glycolyse débute dans le cytoplasme par la conversion de glucose en pyruvate. Ce pyruvate peut ensuite être utilisé par la cellule de deux manières différentes. Dans le cadre d'un métabolisme aérobie, le pyruvate entre dans les mitochondries où il est oxydé en acétylCoA, substrat du cycle de Krebs permettant la production d'énergie par phosphorylation oxydative (OXPHOS) via la chaîne respiratoire. En revanche, dans des conditions anaérobiques, le pyruvate est métabolisé en lactate ce qui permet la génération de NAD⁺ nécessaire à la voie glycolytique. Ce métabolisme, uniquement glycolytique, est moins efficace pour la production d'énergie (bilan net de 2 ATP pour 1 molécule de glucose) pour la production d'énergie que l'OXPHOS (bilan net de 36 ATP pour 1 molécule de glucose) (Teslaa and Teitell, 2015).

Concernant les cellules souches pluripotentes, les EpiSC ont une activité glycolytique beaucoup plus importante que les ESC et leur activité mitochondriale est faible (Zhou et al., 2012). Le métabolisme des EpiSC repose donc majoritairement sur la glycolyse. De plus, elles ne survivent pas à l'inhibition de la glycolyse (Zhou et al., 2012). A l'inverse, les ESC ont une activité mitochondriale beaucoup plus élevée que les EpiSC (Zhou et al., 2012). Cependant, elles produisent également de l'énergie via la glycolyse (Zhou et al., 2012). De part cette bivalence métabolique, la production énergétique des ESC est basée à la fois sur l'OXPHOS mais également sur la glycolyse (Figure 8) (Zhou et al., 2012).

2.1.2.5. Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire qui est composé de quatre phases : G1, S, G2 et M. La phase S est la phase de réplication de l'ADN et la phase M est celle de ségrégation des chromosomes. Chaque phase est régulée par des kinases (*Cyclin Dependent Kinase* ou Cdk) associé à des Cyclines (Boward et al., 2016). La vitesse de prolifération dépend de la durée de la phase G1 des cellules car l'entrée dans la phase S est régulée par les protéines Rb et p53 (Weinberg, 1995; Lane, 1992). Dans les cellules différenciées, la protéine Rb, hypophosphorylée, est rephosphorylée par le couple Cycline D/Cdk4 pendant la phase G1 pour permettre l'expression de gènes impliqués dans l'entrée en phase S (Weinberg, 1995; Harbour and Dean, 2000). Lors de dommages à l'ADN, dans les cellules différenciées, la protéine p53 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et les cellules ne peuvent pas poursuivre le cycle cellulaire (Lane, 1992).

La durée de la phase G1 dans les ESC est inférieure à 2h (Savatier et al., 1994). Lorsque les ESC sont converties en EpiSC, la longueur de la phase G1 augmente (Coronado et al., 2013).

La courte durée de la phase G1 dans les ESC s'explique par l'absence de déphosphorylation de Rb due à l'absence de couple Cycline D/Cdk4 (Savatier et al., 1994, 1996). De plus, le couple Cycline E/Cdk2 impliqué dans la transition G1-S est constitutivement activé dans les cellules ESC (Stead et al., 2002). En effet, les ESC expriment peu les inhibiteurs de Cdk2 tel que p21^{Cip1} ou p27^{Kip1} (Savatier et al., 1996; Stead et al., 2002). L'état du cycle cellulaire est lié à l'état de pluripotence. De ce fait, l'inhibition de la Cycline E dans les ESC induit l'augmentation de la durée de la phase G1 ainsi que leur différenciation (Coronado et al., 2013). La durée très courte de la phase G1 dans les ESC s'explique également par l'absence de point de contrôle dépendant de p53 au moment de la transition G1-S. En effet, dans les ESC, p53 n'est pas actif car séquestré dans le cytoplasme (Aladjem et al., 1998).

Ainsi les cellules dans l'état naïf de pluripotence montrent une phase G1 courte et indépendante des régulations médiées par Rb et p53 (Savatier et al., 1994, 1996; Aladjem et al., 1998). En revanche, les cellules dans l'état amorcé de pluripotence ont une phase G1 plus longue (Figure 8) (Coronado et al., 2013).

2.1.2.6. Épigénome et statut du chromosome X

Les modifications épigénétiques surviennent au niveau de la chromatine, sans changement de la séquence d'ADN, pour réguler la transcription du génome (Lim et al., 2016). Elles comprennent la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et la présence d'ARN non-codants (Thiagarajan et al., 2014; Takahashi et al., 2018). La méthylation de l'ADN est considérée comme une marque épigénétique répressive (Smith and Meissner, 2013). Cette méthylation, qui cible essentiellement les résidus Cytosine, est induite par les enzymes *DNA methyltransferase* (DNMT) (Xu et al., 2021). La méthylation de l'ADN rend la chromatine plus compacte et donc moins permissive à la transcription (Smith and Meissner, 2013).

Durant le développement embryonnaire pré-implantatoire, le génome du zygote est soumis à une déméthylation rapide, qui se poursuit ensuite progressivement au cours des stades embryonnaires suivants (Lim et al., 2016; Xu et al., 2021). Ainsi, le génome de l'embryon pré-implantatoire de souris est globalement hypométhylé ce qui est associé à un état chromatinien plus ouvert et permissif à la transcription (Smith et al., 2012; Ficz et al., 2011). De manière similaire, le génome des ESC à l'état naïf de pluripotence est globalement hypométhylé, comme celui des cellules de l'ICM (Ficz et al., 2013; Leitch et al., 2013; Bao et al., 2018). En revanche, l'ADN des EpiSC est globalement hyperméthylé (Figure 8) (Bao et al., 2018).

Les modifications post-traductionnelles des histones (méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination, etc.) peuvent être activatrices ou inhibitrices de la transcription (Xu et al., 2021). Ces modifications permettent de moduler l'activité des *enhancers* et des promoteurs de gènes différemment en fonction de l'état de pluripotence des cellules (Factor et al., 2014). Par exemple, l'*enhancer* distal de *Pou5f1* est enrichi en modifications activatrices dans les ESC contrairement aux EpiSC (Yeom et al., 1996; Tesar et al., 2007; Factor et al., 2014). Inversement, l'*enhancer* proximal de *Pou5f1* permet la transcription de *Pou5f1* dans les EpiSC (Yeom et al., 1996; Tesar et al., 2007; Factor et al., 2014).

Les modifications épigénétiques jouent également un rôle clé dans l'inactivation d'un des deux chromosomes X durant le développement des embryons femelles XX. Cette inactivation est nécessaire pour compenser la surexpression des gènes du X par rapport aux embryons mâles (Schulz and Heard, 2013). Dès le stade 2-4-cellules, dans les embryons femelles, le chromosome X paternel est inactivé. Au stade blastocyste, les cellules de l'ICM réactivent ce chromosome X alors que les cellules du TE maintiennent l'inactivation du chromosome X paternel. Puis, les cellules de l'EPI des embryons femelles XX sont soumises à l'inactivation aléatoire d'un chromosome X au moment de l'implantation (Schulz and Heard, 2013; Kobayashi et al., 2016). Les EpiSC et les ESC récapitulent le statut d'activation du chromosome X de l'EPI pré- et post-implantatoire (Figure 8). Ainsi, les EpiSC XX ont un chromosome X inactif et les ESC XX ont leur deux chromosomes X actifs (Kobayashi et al., 2016). L'inactivation du chromosome X, dans l'embryon comme dans les EpiSC, implique le long ARN non-codant *X-inactivation specific transcript (Xist)* (Kobayashi et al., 2016; Augui et al., 2011). Lors de l'inactivation du chromosome X, le *Xist* est exprimé par un des deux chromosomes X et se lie à ce dernier pour l'inactiver (Augui et al., 2011; Avner and Heard, 2001). De plus, le *Xist* induit le recrutement de complexes protéiques entraînant des modifications post-traductionnelles d'histones comme la triméthylation répressive de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) et l'ubiquitination répressive de la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119Ub) pour maintenir l'inactivation du chromosome X (Żylicz et al., 2019; Kobayashi et al., 2016; Guo et al., 2009).

2.1.3. Entre la pluripotence naïve et amorcée : l'état formatif

2.1.3.1. La capture de l'état formatif de pluripotence

Les cellules de l'EPI à E4.5 sont dans l'état naïf de pluripotence et celles de l'EPI à E6.5-7.5 sont dans l'état amorcé de pluripotence. Cependant, la pluripotence ne correspond pas seulement à deux états distincts. Entre E5.0 et E6.5, les cellules de l'EPI sont dans l'état formatif de pluripotence (Smith, 2017; Kinoshita and Smith, 2018). Les cellules de l'EPI entre E5.5 et E6.25, dans l'état formatif de pluripotence, ont la capacité unique de s'engager dans la différenciation en cellules germinales primordiales (*Primordial Germ cells* ou PGC) à l'origine des cellules germinales (Ohinata et al., 2009).

Lors de la conversion des ESC vers l'état amorcé de pluripotence dans un milieu contenant de l'activine A à faible concentration, du Fgf2 et 1% de KSR, les ESC sortent de la pluripotence naïve et passent transitoirement dans l'état formatif de pluripotence où elles sont réceptives à l'induction de la différenciation en PGC. Ce sont les *EpiBlast-Like Cells* (EpiLC) (Hayashi et al., 2011). Dans ces cellules, l'activine A active la voie Nodal/Activine et le Fgf2 active la voie FGF/MAPK. De plus, l'activation de la voie canonique Wnt par l'inhibition de Gsk3 permet d'auto-renouveler les EpiLC dans l'état formatif de pluripotence (Luo et al., 2023). Cependant, les EpiLSC sont hétérogènes et contiennent différentes sous-populations correspondants à différents états formatifs de l'EPI entre E5.0 et E6.5 (Luo et al., 2023). En 2021, Kinoshita *et al.* ont établi des conditions de culture permettant la dérivation de PSC ou Formative Stem cells (FS) à partir d'EPI à E5.5 et soutenant leur auto-renouvellement dans l'état formatif de pluripotence (Kinoshita et al., 2021). Le milieu de culture des FS contient de l'activine A en faible concentration, activant la voie Nodal/Activine, et un inhibiteur des tankyrases, le XAV939, bloquant la voie canonique Wnt (Kinoshita et al., 2021). De plus, les FS dépendent de la voie FGF/MAPK pour s'auto-renouveler (Kinoshita et al., 2021). Les FS peuvent se différencier en PGC et leur transcriptome correspond à celui des cellules de l'EPI à E5.5-6.0 (Kinoshita et al., 2021; Luo et al., 2023).

Il est également possible d'obtenir des PSC à l'état formatif directement en mettant en culture des embryons entiers à E3.5 dans un milieu contenant de l'activine A, du Fgf2 et ligand Wnt3a, activant la voie canonique Wnt. Les cellules ainsi obtenues sont appelées FTW-PSC (Yu et al., 2021). De plus, durant la première semaine de culture, la voie MEK est inhibée pour éviter la multiplication des cellules extra-embryonnaires (Yu et al., 2021). Les FTW-PSC peuvent se différencier en PGC et leur transcriptome correspond à celui des EPI dans l'état formatif de pluripotence à E5.0-5.5 (Yu et al., 2021; Luo et al., 2023).

Ainsi, grâce aux FS, FTW-PSC et EpiLSC, il est possible de capturer *in vitro* différents états de pluripotence formative correspondants aux différents états de pluripotence formative de l'EPI entre E5.0 et E6.5 (Figure 5).

2.1.3.2. Régulation de l'état formatif de pluripotence

La pluripotence formative est soutenue par la voie FGF/MAPK, activée par le Fgf2, et la voie Nodal/Activine/Smads activé par l'activine A (Figure 9) (Smith, 2017). Durant la sortie de la pluripotence naïve, Erk, effecteur de la voie FGF/MAPK, inhibe Nanog réprimant alors la transcription de *Esrrb* (Figure 9) (Mulas et al., 2023). Ceci déstabilise le réseau de pluripotence naïve et active le réseau de pluripotence formative (Mulas et al., 2023). En effet, l'inhibition de Erk empêche l'entrée et le maintien dans la pluripotence formative des ESC (Mulas et al., 2023). De plus, la voie Wnt est également impliquée dans la régulation de la pluripotence formative mais son effet est dépendant du contexte (Figure 9) (Luo et al., 2023). En effet, l'activation de la voie canonique Wnt des FTW-PSC, dont le transcriptome est proche de la pluripotence naïve, permet leur auto-renouvellement comme pour les ESC (Kinoshita et al., 2021; Luo et al., 2023). Au contraire, l'inhibition de la voie canonique Wnt des FS, dont le transcriptome est proche de la pluripotence amorcée, permet leur auto-renouvellement (Yu et al., 2021; Luo et al., 2023).

La pluripotence formative est caractérisée par l'expression des gènes associés à la pluripotence *Pou5f1*, *Sox2* et *Nanog* ainsi que des gènes spécifiques de la pluripotence formative comme *Otx2*, *Pou3f1* et *Dnmt3b* (Luo et al., 2023; Kinoshita et al., 2021; Yu et al., 2021; Hayashi et al., 2011). En revanche, l'état formatif de pluripotence est caractérisé par une faible expression des gènes régulant la pluripotence naïve comme *Esrrb*, *Klf4*, *Klf5*, *Tbx3* et *Dnmt3b* (Luo et al., 2023; Kinoshita et al., 2021; Yu et al., 2021; Hayashi et al., 2011). De plus, les PSC à l'état formatif de pluripotence expriment très peu ou pas les marqueurs de la ligne primitive associés à la pluripotence amorcée tels que *Brachyury* et *Foxa2* (Luo et al., 2023; Kinoshita et al., 2021; Yu et al., 2021; Hayashi et al., 2011).

La pluripotence formative est régulée par différents facteurs de transcriptions comme *Otx2*, *ETS Variant Transcription Factor 5* (*Etv5*) et *Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region* (*Rbpj*) (Figure 9). Premièrement, *Otx2* est un facteur majeur de la sortie de la pluripotence naïve et un facteur de transcription clé dans le maintien de la pluripotence formative. En effet, la délétion d'*Otx2* empêche le maintien en culture des PSC à l'état formatif de pluripotence et induit leur différenciation (Kinoshita et al., 2021). Deuxièmement, *Etv5* est un facteur de transcription de la famille des facteurs ETS. Il est activé par la voie Fgf/Mek (Kalkan et al., 2019). La délétion de *Etv5* dans les ESC empêche leur

transition de l'état naïf vers l'état formatif de pluripotence (Kalkan et al., 2019). De plus, Etv5 est fixé sur les *enhancers* de gènes associés à la pluripotence formative tel que *Fgf5*, *Lef1* et *Pou3f1* durant la sortie de pluripotence naïve (Kalkan et al., 2019). Enfin, Rbpj est un autre acteur de la transition vers la pluripotence formative des ESC et sa délétion empêche cette transition (Kalkan et al., 2019). Rbpj agit comme répresseur transcriptionnel en liant les promoteurs des facteurs de pluripotence naïve tel que *Tbx3* pour réprimer leur expression (Kalkan et al., 2019).

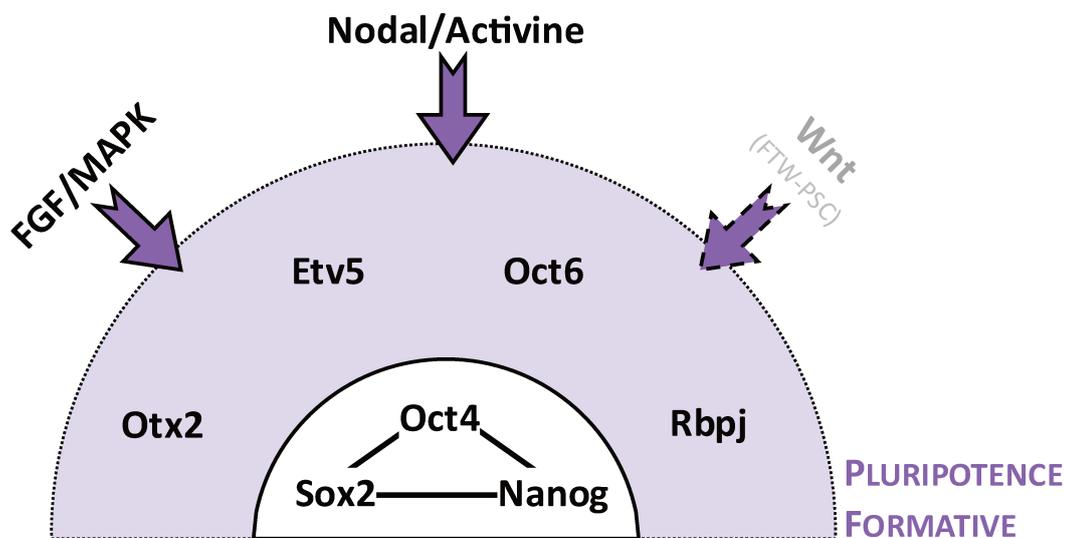


Figure 9 : Réseau de facteurs de transcription régulant la pluripotence formative chez la souris.

Schéma représentant les facteurs de transcription du noyau de pluripotence (au centre) et le réseau élargi de facteur de transcription régulant la pluripotence formative (en violet) ainsi que les voies de signalisation régulant positivement ce réseau.

2.1.4. Capacité de colonisation des PSC chez la souris

Pour caractériser l'état de pluripotence des PSC il est important de connaître leur potentiel développemental *in vivo*. Pour cela, la production de chimères par injection de PSC dans un embryon pré-implantatoire hôte est un outil puissant.

2.1.4.1. Chimères intraspécifiques chez la souris

Les cellules dans l'état naïf de pluripotence forment très efficacement des individus chimères viables après injection dans des embryons pré-implantatoires de souris. En effet, après injection dans un embryon entre E2.5 et E3.5, les PSC dans l'état naïf de pluripotence comme les ESC en condition 2iLIF ou LIF/FCS survivent et prolifèrent en harmonie avec l'embryon de souris hôte (Masaki et al., 2015; Huang et al., 2008). Elles sont pluripotentes et contribuent donc à l'ICM puis à tous les tissus formant un organisme adulte sans pouvoir contribuer au TE ([Tableau 2](#)) (Beddington and Robertson, 1989; Masaki et al., 2015; Wang and Jaenisch, 2004). Les ESC ont un taux de formation de chimères intra-spécifiques élevé avec 90% des embryons pré-implantatoires colonisés et plus de 60% des nouveau-nés composés de cellules issues des ESC injectées ([Tableau 3](#)) (Masaki et al., 2015; Ying et al., 2008; Tesar et al., 2007). De plus, les ESC participent fortement (>50%) au développement de l'organisme (Beddington and Robertson, 1989). En plus de contribuer aux trois feuillets embryonnaires, les ESC contribuent à la lignée germinales, formant ainsi des chimères germinales (Nagy et al., 1990; Kraus et al., 2010; Ying et al., 2008; Masaki et al., 2015). Ces chimères germinales peuvent être croisée entre elles et transmettre le génome des ESC injectées à la génération suivante (Nagy et al., 1990; Kraus et al., 2010). Grâce à cette compétence, l'utilisation des ESC est un puissant outil pour produire des souris génétiquement modifiées (Saunders, 2020).

À l'inverse, les PSC à l'état amorcée de pluripotence comme les EpiSC ne produisent pas de chimères après injection dans des embryons pré-implantatoires de souris ([Tableau 3](#)) (Tesar et al., 2007; Brons et al., 2007). Elles peuvent uniquement coloniser des embryons post-implantatoires de souris à E7.5 (Huang et al., 2012; Kojima et al., 2014). Ceci suggère que l'état de pluripotence des PSC injectées doit être en adéquation avec celui des cellules de l'embryon au moment de l'injection. C'est l'équivalence développementale. Par conséquent, l'injection de cellules ESC dans des embryons post-implantatoires à E7.5 n'aboutit pas à la formation de chimères (Huang et al., 2012).

Quant aux PSC à l'état formatif de pluripotence, elles ont une capacité modérée à former des chimères après injection dans des embryons pré-implantatoires de souris ([Tableau 3](#)). Les FS forment des fœtus chimères après injections dans des blastocystes murins à E3.5. Cependant, les FS forment moins efficacement des chimères que les ESC et seulement 30% des fœtus obtenus sont chimériques (Kinoshita et al., 2021). En revanche, les FTW-PSC, qui sont plus proches de l'état naïf de pluripotence, ont une efficacité de chimérisme supérieure aux FS avec 50 à 60% des fœtus ou nouveau-nés obtenus présentant du chimérisme (Yu et al., 2021). Les FS comme les FTW-PSC colonisent l'ICM puis les trois feuillets embryonnaires ainsi que la lignée germinale ([Tableau 3](#)) (Kinoshita et al., 2021; Yu et al., 2021).

En 2017, Yang Jian *et al.* ont développé un milieu de culture permettant de convertir les ESC en PSC dont le potentiel développemental est augmenté (*Expanded potential stem cells* ou EPSC) (Yang et al., 2017a). Ce milieu contient du LIF activant la voie LIF/STAT3 et un cocktail de six inhibiteurs ciblant les voies MAPK, l'axe Wnt/Hippo/Parp et la kinase Src (Yang et al., 2017a). L'injection dans des embryons de souris 8-cellules des EPSC ainsi obtenues produit des chimères post-implantatoires à E6.5 avec 56% des embryons contenant des cellules issues des EPSC (Tableau 3) (Yang et al., 2017a). Parmi ces embryons chimériques, 62% présentent des cellules issues des EPSC dans les tissus embryonnaires ainsi que dans les tissus dérivant du TE (Tableau 2) (Yang et al., 2017a). Ainsi, le potentiel développemental des EPSC est étendu au TE. La même année, Yang Yang *et al.* ont mis au point un milieu de culture appelé LCDM, contenant du LIF, un inhibiteur de Gsk3 (CHIR99021), un inhibiteur des récepteurs muscariniques et histaminiques ((S)-(+)-Diméthindène maléate ou DiM) et un inhibiteur de Parp1 (Minocycline hydrochloride ou MiH) (Yang et al., 2017b). La culture des ESC dans ce milieu de culture les convertit en *Extended pluripotent stem cells* (EPS-LCDM) qui ont, comme les EPSC, le potentiel de contribuer à l'embryon lui-même ainsi qu'au TE (Tableau 2) (Yang et al., 2017b). Après l'injection d'une seule EPS-LCDM dans un embryon 8-cellules de souris, 60% des blastocystes obtenues sont chimériques (Tableau 3) (Yang et al., 2017b). Parmi les blastocystes chimériques, 55% présentent une colonisation de l'ICM et du TE par les EPS-LCDM (Yang et al., 2017b). L'injection d'une EPS-LCDM dans un embryon 8-cellules produit des chimères nouveau-nés et 52% des petits sont chimériques à la naissance (Tableau 3) (Yang et al., 2017b). Comme les ESC, les EPS-LCDM produisent des chimères germinales (Tableau 2) (Yang et al., 2017b).

Les EPS-LCDM et EPSC ont un transcriptome différent de celui des cellules totipotentes de l'embryon et expriment des gènes associés à la pluripotence (Yang et al., 2017a; b; Yu et al., 2021). Ces cellules sont donc dans un état de pluripotence intermédiaire. Elles contribuent à tous les tissus formant un organisme adulte et présentent un potentiel développemental étendu aux tissus extra-embryonnaires (Tableau 2) (Yang et al., 2017a; b).

Ainsi, il est possible de produire des chimères germinales grâce aux PSC. La compétence chimérique est une caractéristique de l'état naif de pluripotence mais cette compétence est partagée, de manière plus modérée, par les PSC à l'état formatif de pluripotence. Pour permettre la production de chimères, l'état de pluripotence de ces PSC doit être en adéquation avec l'état de pluripotence des cellules de l'embryon (Figure 10).

	ESC	FTX-PSC	FS	EpiSC	EPS-LCDM	EPSC
ICM	X	X	X	-	X	X
TE	-	-	-	-	X	X
3 feuillets embryonnaires	X	X	X	-	X	X
Lignée germinale	X	X	nc	-	nc	nc
Annexes embryonnaires	-	-	nc	-	X	X

nc : non communiqué

Tableau 2 : Potentiel développemental des PSC chez la souris après injection dans un embryon pré-implantatoire.

Les croix vertes correspondent à la capacité des lignées cellulaires (colonnes) à se différencier dans le lignage énoncé dans les lignes.

PSC (état de pluripotence)	Stade de l'embryon hôte	Chimères pré-implantatoires	Chimères fœtales	Chimères à la naissance	Références
mESC LIF/FCS (naïf)	blastocyste ou 8-cellules	89%	-	71%	(Alexandrova et al., 2015; Huang et al., 2008; Tesar et al., 2007)
mESC 2i/LIF (naïf)	8-cellules à blastocyste	93%	-	72%	(Ying et al., 2008; Alexandrova et al., 2015; Masaki et al., 2015; Yu et al., 2021)
iPSC (naïf)	blastocyste	-	-	63%	(Masaki et al., 2015)
EpiSC (amorcé)	blastocyste	0%	0%	0%	(Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Masaki et al., 2015; Kinoshita et al., 2021)
FS (formatif)	blastocyste	-	31%	-	(Kinoshita et al., 2021)
FTW-PSC (formatif)	blastocyste	-	53%	59%	(Yu et al., 2021)
EPSC	morula	-	56%	-	(Yang et al., 2017a)
EPS-LCDM	8-cellules	60%	-	52%	(Yang et al., 2017b)

0% : absent / ≤25% : faible / 26-50% : moyen à faible / 51-60% : moyen à fort / >60% : élevé

Tableau 3 : Capacité de colonisation des différentes lignées de PSC de souris après injection dans des embryons pré-implantatoires de souris.

Données détaillées dans le tableau S1 des annexes.

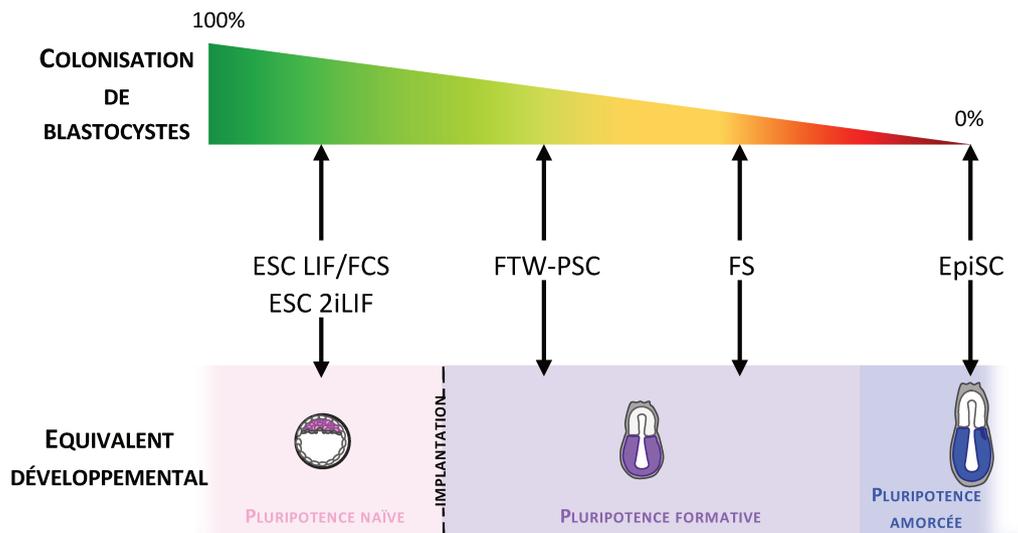


Figure 10 : Gradient de chimérisme intra-espèce des PSC chez la souris.

Schéma représentant les différentes lignées de PSC de souris (au milieu), leur équivalent développemental (en bas) et leur capacité à coloniser l'embryon précoce de souris.

2.1.4.2. Chimères inter-espèces chez les rongeurs

Les PSC de rongeurs à l'état naïf de pluripotence colonisent également les embryons d'autres espèces (Kobayashi et al., 2010; Xiang et al., 2008; Aksoy et al., 2021).

Tout d'abord, il est possible d'obtenir des PSC naïves de mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*) (Xiang et al., 2008). Ce rongeur a évolutivement divergé de la souris il y a 10,7 millions d'années (<https://timetree.org/>) et forme, avec la souris, deux espèces différentes. L'injection des PSC naïves de mulots sylvestres dans des blastocystes de souris produit des individus chimériques viables (Xiang et al., 2008). En revanche, l'efficacité d'obtention de chimères est plus faible que lors de la production de chimères intra-spécifiques chez la souris et seulement 7% des petits obtenus sont chimériques (Tableau 4) (Xiang et al., 2008). Ceci peut s'expliquer par la divergence évolutive existant entre le mulot sylvestre et la souris (Figure 11) (Xiang et al., 2008).

Il est également possible d'obtenir des chimères inter-espèces souris-rat. En effet, les ESC de souris injectées dans des blastocystes de rat produisent des chimères et environ 50% des fœtus obtenus sont des chimères (Tableau 4) (Kobayashi et al., 2010). Après transfert dans l'utérus de rattes pseudo-gestantes, ces embryons chimériques donnent des nouveau-nés chimères rat-souris (Kobayashi et al., 2010). Comme lors de la formation de chimères intra-espèces, les ESC de souris colonisent les trois feuillets embryonnaires sans coloniser les tissus

extra-embryonnaires de l'embryon de rat (Kobayashi et al., 2010). La souris et le rat ont évolutivement divergé il y a 13 millions d'années (<https://timetree.org/>) mais cela n'empêche pas l'obtention de chimères nouveau-nés viables. En revanche, l'efficacité de production de chimères n'est pas aussi élevée que lors de l'injection d'ESC de souris dans un embryon pré-implantatoire de souris (Kobayashi et al., 2010). De plus, ces chimères inter-espèces souris-rat présentent un taux de malformations plus élevé les chimères intra-espèces (Yamaguchi et al., 2018).

Il est également possible d'obtenir des chimères après injection de PSC naïves de campagnol des prairies (*Microtus ochrogaster*) dans des embryons pré-implantatoires de souris (Wu et al., 2016). Cependant, l'efficacité de production de chimères, le taux de chimérisme ainsi que la survie à l'âge adulte des chimères campagnol-souris sont moins élevés que dans le cas des chimères rat-souris (Wu et al., 2016). Ceci peut également s'expliquer par le fait que le campagnol est évolutivement plus distant de la souris que ne l'est le rat ([Figure 11](#)) (dernier ancêtre commun datant d'il y a 26,9 millions d'années : <https://timetree.org/>) (Wu et al., 2016).

De plus, les ESC de souris peuvent également coloniser des embryons de lapin qui sont évolutivement plus distants de la souris que le mulot, le rat ou le campagnol (dernier ancêtre commun datant d'il y a 79 millions d'années : <https://timetree.org/>) (Aksoy et al., 2021). L'injection des cellules ESC de souris dans des morulas de lapin aboutit à plus de 90% de blastocystes chimériques ([Tableau 4](#)) (Aksoy et al., 2021). Après transfert dans l'utérus de lapines pseudo-gestantes, 60% des fœtus sont chimériques ([Tableau 4](#)) (Aksoy et al., 2021). Les ESC colonisent l'EPI de l'embryon de lapin puis leur colonisation est restreinte au neurectoderme dans les fœtus chimériques à E9 (Aksoy et al., 2021). De plus, dans les chimères souris-lapin, la contribution fœtal des ESC est moins importante que lors de la formation de chimères intraspécifiques souris-souris (Aksoy et al., 2021). La divergence évolutive entre la souris et le lapin peut expliquer la faible contribution des ESC aux fœtus de lapin ([Figure 11](#)) (Aksoy et al., 2021).

De plus, lors de l'injection de PSC naïves de souris dans des blastocystes de porc (*Sus scrofa domesticus*), évolutivement plus distants de la souris que la lapin, le rat ou le mulot (dernier ancêtre commun datant d'il y a 94 millions d'années : <https://timetree.org/>), n'aboutit pas à la formation de fœtus chimériques souris-porc ([Tableau 4 ; Figure 11](#)) (Wu et al., 2017).

En somme, les ESC de souris peuvent coloniser des embryons d'autres espèces mais moins efficacement et de manière moins importante qu'en intra-espèce. De plus, ces travaux suggèrent que la capacité de colonisation des ESC de souris semble être impactée par la distances phylogénétique les séparant de l'espèce de l'embryon hôte ([Figure 11](#)).

PSC (état de pluripotence)	Stade de l'embryon hôte (espèce)	Chimères pré-implantatoires	Chimères fœtales	Chimères à la naissance	Références
ESC LIF/FCS souris (naïf)	morula (lapin)	99% (235/238 blastocystes)	60% (12/20 fœtus)	-	(Aksoy et al., 2021)
iPSC souris (naïf)	blastocyste (rat)	-	~50%	-	(Kobayashi et al., 2010)
	blastocyste (porc)	-	0% (0/26 fœtus)	-	(Wu et al., 2017)
iPSC mulot sylvestre (naïf)	blastocyste (souris)	-	-	7% (16/220 petits)	(Xiang et al., 2008)

0% : absent / ≤25% : faible / 26-50% : moyen à faible / 51-60% : moyen à fort / >60% : élevé

Tableau 4 : Capacité de colonisation des PSC de rongeurs après injection dans des embryons pré-implantatoires de différentes espèces.

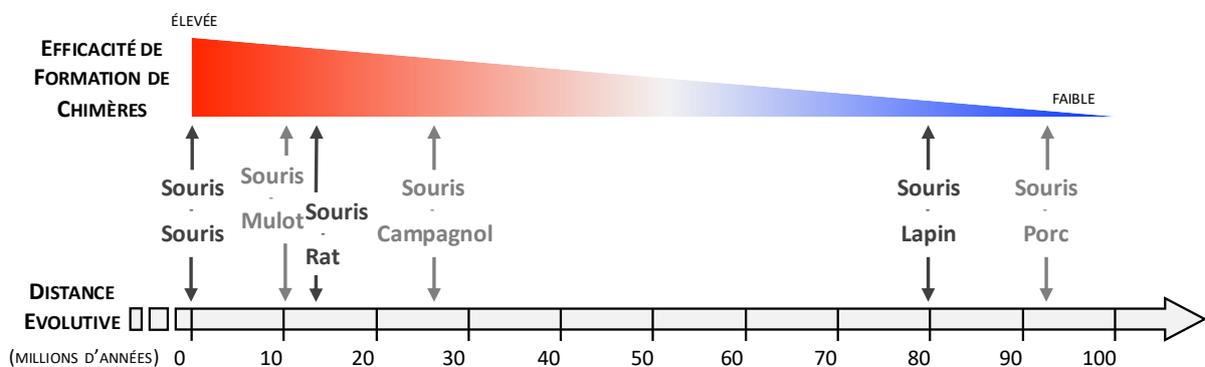


Figure 11 : Gradient de chimérisme inter-espèce des PSC de souris.

Schéma représentant les espèces des PSC naïve donneuses et des embryons hôte (au milieu), leur distance évolutive (en bas) et leur capacité à former des chimères après injection des PSC donneuses dans les embryons hôtes (en haut).

2.1.4.3. Complémentation développementale chez la souris

Dans un but de médecine régénérative, il est important de pouvoir produire des organes entiers à partir de PSC pour pouvoir remplacer les organes dysfonctionnels chez les patients (Wu et al., 2016). Les ESC peuvent régénérer un organe après injection dans un embryon hôte portant une mutation empêchant le développement de l'organe cible. C'est la complémentation développementale (Wu et al., 2016).

Pour produire un organe à partir de PSC en utilisant la complémentation développementale, il faut créer une niche développementale pour cet organe. Par exemple, la délétion du gène *Pdx1* dans les embryons de souris empêche le développement du pancréas, organe impliqué dans la régulation de la glycémie (Kobayashi et al., 2010). De ce fait, la délétion du gène *Pdx1* dans les embryons de souris produit alors une niche permettant l'organogenèse pancréatique (Kobayashi et al., 2010). L'injection de PSC naïves de souris dans les embryons pré-implantatoires de souris *Pdx1*^{-/-} suivis de leur transfert dans l'utérus de souris pseudo-gestantes, ont aboutis à la naissance de souriceaux possédant un pancréas (Kobayashi et al., 2010). Ces pancréas étaient totalement composés de cellules issus des PSC injectées et étaient histologiquement normaux (Kobayashi et al., 2010). De plus, un test de tolérance au glucose a montré une sécrétion d'insuline, hormone sécrétée par le pancréas pour réguler le taux de glucose sanguin (Kobayashi et al., 2010). Ceci indique que les pancréas obtenues à partir des PSC injectées étaient fonctionnels (Kobayashi et al., 2010). De la même manière, l'injection d'ESC de souris dans des blastocystes de souris mutés pour le gène *Fgf10*, régulateur majeur du développement pulmonaire, restaure le développement des poumons (Kitahara et al., 2020).

La complémentation développementale est également possible de manière interspécifique. En effet, l'injection de PSC naïves de rat dans les embryons de souris *Pdx1*^{-/-} produit des chimères dont le pancréas est totalement issu de cellules de rat (Kobayashi et al., 2010). De manière intéressante, le pancréas a alors la taille d'un pancréas de souris et non pas de celui de rat, suggérant une adaptation de la taille de l'organe à la taille de l'embryon hôte (Kobayashi et al., 2010). De plus, ce dernier est histologiquement normal ainsi que fonctionnel (Kobayashi et al., 2010).

La complémentation développementale chez le rongeur fonctionne également avec d'autres modèles comme la génération de rein issus d'ESC de souris après leur injection dans des embryons pré-implantatoires de rat mutés pour le gène *Sall1* (Goto et al., 2019). Chez la souris, la délétion du gène *Nkx2.5* provoquent d'importantes malformations cardiaques et l'injection de PSC naïves de rat dans ces embryons de souris *Nkx2.5*^{-/-} permet de restaurer une formation cardiaque normale (Wu et al., 2017). De plus, la complémentation

développementale est possible par injection de PSC naïves de rat dans des embryons de souris *Pax6*^{-/-} pour restaurer le développement de l'œil (Wu et al., 2017).

2.2. Chez le lapin

2.2.1. Capture de la pluripotence *in vitro*

2.2.1.1. Cellules souches pluripotentes et pluripotence amorcée

Chez le lapin, il est possible de dériver des ESC (*rabbit Embryonic Stem Cells* ou rbESC) partir de l'ICM d'embryons à E3.5-4.0 en présence de cellules nourricières, de FGF2 et de KSR (Wang et al., 2007; Honda et al., 2008; Osteil et al., 2013; Afanassieff et al., 2015). Il est également possible d'obtenir des iPSC (*rabbit induced Pluripotent Stem Cells* ou rbiPSC) grâce à la surexpression de *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* et *cMYC*, et en présence de cellules nourricières, de FGF2 et de KSR (Osteil et al., 2013; Honda et al., 2010).

Les rbESC et rbiPSC obtenues s'auto-renouvellent en culture (Wang et al., 2007; Honda et al., 2008; Osteil et al., 2013; Honda et al., 2010). Elles sont pluripotentes et peuvent se différencier dans les trois feuilletts embryonnaires (Wang et al., 2007; Honda et al., 2008; Osteil et al., 2013; Honda et al., 2010). De plus, elles expriment les gènes du noyau de pluripotence *OCT4*, *SOX2* et *NANOG* (Wang et al., 2007; Honda et al., 2008; Osteil et al., 2013; Honda et al., 2010). Comme les EpiSC chez la souris, les rbESC et rbiPSC forment de larges colonies plates (Wang et al., 2007; Honda et al., 2008; Osteil et al., 2013; Honda et al., 2010). En effet, les rbESC et rbiPSC sont dans l'état amorcé de pluripotence et expriment donc des gènes associés à la pluripotence amorcée comme *OTX2* et *PITX2* (Figure 12) (Afanassieff et al., 2020; Osteil et al., 2013). Comme chez la souris, la pluripotence amorcée des rbESC et rbiPSC est soutenue par les voies FGF/MAPK et Nodal/Activine (Figure 12) (Wang et al., 2008; Honda et al., 2009). De plus, la voie LIF/STAT3 n'est pas essentielle au maintien des rbESC et rbiPSC (Figure 12) (Honda et al., 2009; Tapponnier et al., 2017). Comme dans les EpiSC, l'un des chromosomes X des lignées de rbESC femelles est inactivé (Figure 12) (Jiang et al., 2014).

En somme, l'absence de connaissance sur les mécanismes régulant la pluripotence naïve chez le lapin ne permet pas encore d'obtenir des milieux de culture contenant les facteurs nécessaires à la stabilisation des PSC dans l'état naïf de pluripotence chez le lapin. Les seules conditions de culture existantes contiennent du FGF2 ce qui induit la dérive des PSC vers l'état amorcé de pluripotence.

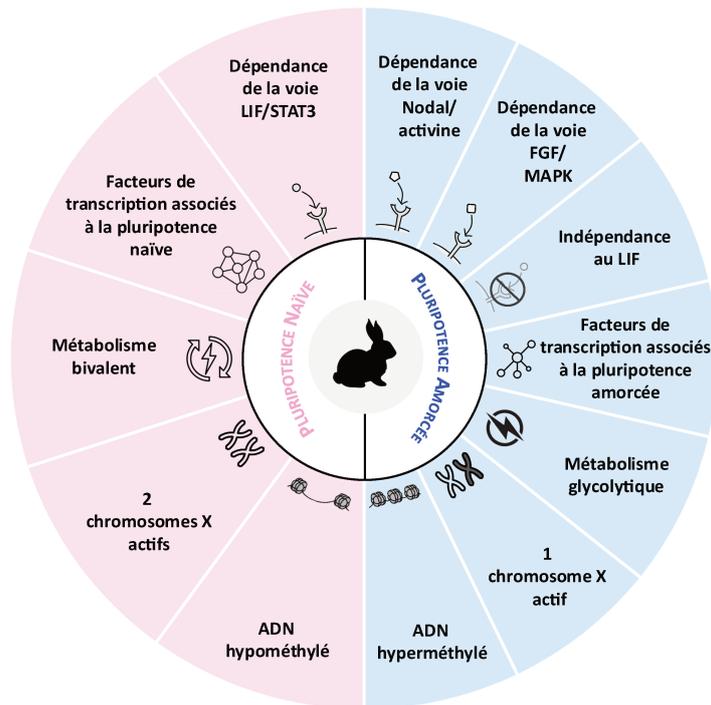


Figure 12 : Caractéristiques de la pluripotence naïve et la pluripotence amorcée chez le lapin.

Caractéristiques principales de la pluripotence naïve *in vivo* chez le lapin (en rose), et de la pluripotence amorcée *in vivo* et des PSC conventionnelles chez le lapin (en bleu).

2.2.1.2. Reprogrammation vers la pluripotence naïve

Chez la souris il est possible de reprogrammer des EpiSC vers l'état naïf pluripotence grâce à la surexpression de différents gènes tels que *Klf2*, *Klf4*, *Nanog* ou *Stat3* (Figure 12) (Hall et al., 2009; Guo et al., 2009; Silva et al., 2009; Yang et al., 2010). Cette stratégie de reprogrammation a été utilisée en 2017 par Tapponnier et al. pour reprogrammer les rbiPSC vers l'état naïf de pluripotence (Tapponnier et al., 2017). Ils ont alors montré que la surexpression de *KLF2* et *KLF4* dans les rbiPSC (*rabbit iPSC Enhanced KLF Activity* ou rbEKA), associée à un milieu de culture contenant du FCS et du LIF, convertissait les rbiPSC dans un état de pluripotence moins amorcé et plus proche de la pluripotence naïve (Tapponnier et al., 2017). Contrairement aux rbiPSC, les cellules rbEKA expriment plus fortement les gènes associés à la pluripotence naïve comme *REX1* ou *ESRRB* (Tapponnier et al., 2017). Cependant, le transcriptome des rbEKA reste proche de celui de l'EPI dans l'état amorcé de pluripotence à E6.0 (Tapponnier et al., 2017; Bouchereau et al., 2022). De plus, l'auto-renouvellement des rbEKA dépend encore des voies FGF/MAPK et Nodal/Activine (Tapponnier et al., 2017). Ceci suggère que ces PSC sont finalement encore dans l'état amorcé de pluripotence (Tapponnier

et al., 2017; Afanassieff et al., 2020). Actuellement, il n'existe pas de méthode décrite dans la littérature pour reprogrammer et stabiliser les PSC de lapin dans un état naïf de pluripotence.

2.2.2. Caractéristiques de la pluripotence naïve

Chez le lapin, les cellules de l'ICM à E3.5-E4.0 sont dans un état naïf de pluripotence (Bouchereau et al., 2022). Les cellules de l'ICM sont caractérisées par l'expression de gènes associés à la pluripotence naïve comme *ESRRB*, *DPPA5*, *FOLR1* ou *KDM4A* (Figure 12) (Bouchereau et al., 2022). De plus, elles expriment des gènes de la voie LIF/STAT comme le co-récepteur du LIF *IL6ST* ou encore *STAT3* (Bouchereau et al., 2022). Ceci suggère que, comme chez la souris, la pluripotence naïve implique la voie LIF/STAT3 chez le lapin (Figure 12) (Bouchereau et al., 2022). Puis, à E5.0 les cellules de l'EPI sortent de la pluripotence naïve et expriment des gènes associés à la pluripotence formative tel que *ETV4* (Bouchereau et al., 2022). Enfin, les cellules de l'EPI à E6.0 sont dans l'état amorcé de pluripotence et expriment des gènes associés à la pluripotence amorcée comme *PITX2* ou *CD57* (Bouchereau et al., 2022). Par rapport aux cellules de l'EPI à E6.0, les cellules de l'ICM à E3.5-E4.0 expriment fortement les gènes associés à l'OXPBOS et expriment également certains gènes clés de la glycolyse (Bouchereau et al., 2022). A l'inverse, les cellules de l'EPI à E6.0 expriment des gènes clés de la glycolyse (Bouchereau et al., 2022). Ceci suggère que, dans l'embryon de lapin, les cellules à l'état naïf de pluripotence (ICM E3.5-4.0) reposent sur un métabolisme énergétique bivalent comme dans les PSC naïves de souris (Figure 12) (Bouchereau et al., 2022). Cela suggère également que les cellules de l'EPI à E6.0, dans l'état amorcé de pluripotence, ont un métabolisme majoritairement glycolytique (Bouchereau et al., 2022).

Comme dans les ESC de souris, le génome des cellules de l'ICM à E3.5-E4.0 à l'état naïf de pluripotence est globalement hypométhylé par rapport à celui des cellules de l'EPI à E6.0. (Figure 12) (Bouchereau et al., 2022). De plus, dans les lignées femelles de rbESC, l'un des deux chromosome X est inactivé. Il est recouvert de longs ARN non-codants *XIST* et de marques épigénétiques répressives H3K27me3 (Jiang et al., 2014). En effet, in vivo, dans les cellules de l'EPI à partir de E5.0 le second chromosome X est inactivé comme le montre la présence des longs ARN non-codants *XIST* et des marques épigénétiques répressives H3K27me3 et H2AK119Ub (Okamoto et al., 2011; Bouchereau et al., 2022). En revanche, les cellules naïves de l'ICM à E3.5-E4.0 d'embryons femelles présentent deux chromosomes X actif (Figure 12) (Okamoto et al., 2011; Bouchereau et al., 2022).

2.2.3. Capacité de colonisation des PSC

Comme les EpiSC de souris, les rbiPSC et rbESC n'ont pas la capacité de former des chimères après injection dans des embryons pré-implantatoires (Tableau 5). De plus, les cellules rbEKA produisent de faibles taux de chimérisme après injection dans des embryons de lapin au stade 8-cellules (Tapponnier et al., 2017). En effet, seulement 10% des blastocystes ainsi obtenus sont chimériques et ce taux diminue à 3% après implantation (Tableau 5) (Tapponnier et al., 2017). Cette faible capacité des PSC de lapin à coloniser des embryons pré-implantatoires confirme que les cellules sont dans un état amorcé de pluripotence. Notons que les cellules de l'ICM de lapin à E4.0, qui sont par définition dans l'état naïf de pluripotence, sont bien capables de former des chimères viables après injection dans des embryons pré-implantatoires (discuté dans la partie 1.3.2). Pour l'instant, aucune lignée de PSC de lapin ne permet donc d'obtenir des individus chimériques.

PSC (état de pluripotence)	Stade de l'embryon hôte	Chimères pré-implantatoires	Chimères fœtales	Chimères à la naissance	Références
rbESC (amorcé)	8-cellules à blastocyste	0%	-	0%	(Honda et al., 2008; Osteil et al., 2013, 2016)
rbiSC (amorcé)	8-cellules	1%	-	-	(Osteil et al., 2013; Tapponnier et al., 2017)
rbEKA (amorcé)	8-cellules	10%	3%	-	(Tapponnier et al., 2017)

0% : absent / ≤25% : faible / 26-50% : moyen à faible / 51-60% : moyen à fort / >60% : élevé

Tableau 5 : Capacité de colonisation des différentes lignées de PSC de lapin après injection dans des embryons pré-implantatoires précoces de lapin.

Données détaillées dans le tableau S2 des annexes.

2.3. Chez les primates

2.3.1. Capture de la pluripotence *in vitro* chez les primates

2.3.1.1. Cellules souches pluripotentes et pluripotence amorcée

Chez l'Homme, il est possible de dériver des ESC (hESC) à partir d'embryons pré-implantatoires en présence de FGF2, de cellules nourricières et de substitut de sérum Knockout™ (*Knockout™ serum replacement* ou KSR) (Thomson et al., 1998). Dans les mêmes conditions de culture, il est possible d'obtenir des iPSC humaines (hiPSC) en reprogrammant des cellules différenciées humaines grâce à la surexpression des facteurs OCT4, SOX2, KLF4 et MYC (Takahashi et al., 2007). Comme les ESC de souris, les hPSC sont pluripotentes et peuvent se différencier dans les trois feuilletts embryonnaires (Thomson et al., 1998). De plus, elles expriment les facteurs du noyau de pluripotence OCT4, SOX2 et NANOG (Tesar et al., 2007; Hanna et al., 2010). En revanche, les hPSC ne possèdent pas toutes les caractéristiques des ESC de souris. Elles forment de larges colonies plates qui expriment des gènes associés à la pluripotence amorcée comme *FOXA2*, *PITX2*, *CER1*, *OTX2* et *EOMES* (Tesar et al., 2007; Hanna et al., 2010). De plus, le transcriptome des hPSC est plus proche de celui des EpiSC de souris et de celui des cellules de l'EPI d'embryons post-implantatoires de macaque cynomolgus en début de gastrulation (Tesar et al., 2007; Nakamura et al., 2016). Comme les EpiSC, les hPSC sont dépendantes à la fois de la voie Nodal/Activine et de la voie FGF/MEK (Vallier et al., 2009; Greber et al., 2007, 2010). La voie Nodal/Activine inhibe la différenciation neurectodermale des hPSC (Vallier et al., 2009). Cette voie est activée par l'activine A sécrétée par les cellules nourricières en réponse au FGF2 contenu dans le milieu de culture (Greber et al., 2007). Le FGF2 active également la voie FGF/MEK des hPSC ce qui empêche leur différenciation en neurectoderme (Greber et al., 2010). De plus, l'auto-renouvellement des hPSC est indépendant de la voie LIF/STAT3 comme c'est le cas pour les EpiSC (Dahéron et al., 2004). Ainsi, les hPSC conventionnelles s'auto-renouvellent dans l'état amorcé de pluripotence comme les EpiSC chez la souris.

Il est également possible d'établir des lignées de PSC chez les primates non-humains tel que le macaque rhésus (*Macaca mulatta*), le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*), le macaque à queue de cochon (*Macaca nemestrina*), le macaque japonais (*Macaca fuscata*), le marmoset (*Callithrix jacchus*), le babouin olive (*Papio anubis*), le babouin jaune (*Papio cynocephalus*), le grivet d'Éthiopie (*Chlorocebus aethiops*), le gorille (*Gorilla gorilla*), l'orang-outan (*Pongo abelii*), le bonobo (*Pan paniscus*) ou le chimpanzé (*Pan troglodytes*) (Thomson et al., 1995; Liu et al., 2008; Suemori et al., 2001; Roodgar et al., 2022; Zhong et al., 2011; Nakai et al., 2018; Sasaki et al., 2005; Thomson et al., 1996; Simerly et al., 2009; Chang et al., 2011; Shimoszawa et al., 2010; Geuder et al., 2021; Mora-Bermúdez et al., 2016; Wunderlich

et al., 2014; Gallego Romero et al., 2015; Anwised et al., 2023). Ces PSC de primates non-humains possèdent des caractéristiques similaires aux PSC humaines (hPSC). En effet, elles expriment les gènes du noyau de pluripotence *OCT4*, *SOX2* et *NANOG* mais également des marqueurs de surface associés à la pluripotence amorcée comme *SSEA3*, *SSEA4*, *TRA-1-60* et *TRA-1-81* (Thomson et al., 1995; Liu et al., 2008; Suemori et al., 2001; Zhong et al., 2011; Nakai et al., 2018; Sasaki et al., 2005; Thomson et al., 1996; Simerly et al., 2009; Chang et al., 2011; Shimosawa et al., 2010; Geuder et al., 2021; Wunderlich et al., 2014; Gallego Romero et al., 2015). Comme les hPSC, les PSC de primates non-humains forment de larges colonies plates dont l'auto-renouvellement dépend de la présence de FGF2 et d'activine A (Thomson et al., 1995; Liu et al., 2008; Suemori et al., 2001; Zhong et al., 2011; Nakai et al., 2018; Sasaki et al., 2005; Thomson et al., 1996; Simerly et al., 2009; Chang et al., 2011; Shimosawa et al., 2010; Geuder et al., 2021; Wunderlich et al., 2014; Gallego Romero et al., 2015). Ainsi, les PSC conventionnelles des primates non-humains s'auto-renouvellent dans l'état amorcé de pluripotence.

2.3.1.2. Conversion vers l'état naïf de pluripotence chez l'Homme

En 2010, Hanna *et al.* développent la première méthode de conversion des hPSC vers l'état naïf de pluripotence qui repose sur la surexpression continue des gènes *POU5F1*, *KLF4* et *KLF2* permettant alors de maintenir les hPSC dans un milieu 2iLIF (Hanna et al., 2010). En revanche, en l'absence des transgènes, les hPSC ne survivent pas et se différencient (Hanna et al., 2010). D'autres méthodes de conversion vers l'état naïf reposant sur la surexpression transitoire de gènes ont été développées. La méthode *reset* de Takashima *et al.* combine la surexpression transitoire de *NANOG* et *KLF2* dans un milieu 2iLIF supplémenté d'un inhibiteur de la protéine kinase C (PKC) (Tableau 6) (Takashima et al., 2014). La méthode TL2i de Chen *et al.* est, elle, basée sur la surexpression de *STAT3* associé au milieu 2iLIF (Tableau 6) (Chen et al., 2015a).

En 2013, la première méthode de conversion vers l'état naïf sans transgène est développée par Gafni *et al.* et repose uniquement sur l'ajout de petites molécules et de facteurs de croissance au milieu de culture (Gafni et al., 2013). Actuellement, une dizaine de méthodes de conversion vers l'état naïf ont été développées, appelées NHSM, 5i/L/A, L3i, t2iLGö, PXGL, ENHSM et 4CL (Tableau 6) (Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Zimmerlin et al., 2016; Guo et al., 2017; Bredenkamp et al., 2019a; Bayerl et al., 2021; Mazid et al., 2022). Après conversion, et en fonction des méthodes, les hPSC ont un transcriptome plus ou moins proche de celui des cellules dans l'état naïf de pluripotence de l'EPI pré-implantatoire humain (Blakeley et al., 2015; Stirparo et al., 2018; Mazid et al., 2022). Les hPSC après conversion

n'atteignent pas totalement l'état naïf de pluripotence, comme c'est le cas chez la souris, et sont alors dans un état pseudo-naïf de pluripotence (Blakeley et al., 2015; Stirparo et al., 2018).

Les milieux de conversion vers l'état naïf de pluripotence sont basés sur l'activation de la voie LIF/STAT3 par le LIF, et sur l'inhibition la voie FGF/MAPK comme dans le milieu 2iLIF murin (Figure 13 et Tableau 6) (Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Zimmerlin et al., 2016; Guo et al., 2017; Bredenkamp et al., 2019a; Bayerl et al., 2021; Mazid et al., 2022). L'inhibition de la voie FGF/MAPK est renforcée par l'ajout d'inhibiteurs de SRC dans les milieux 5i/L/A et ENHSM (Theunissen et al., 2014; Bayerl et al., 2021) mais aussi par l'inhibition de BRAF dans le milieu 5i/L/A (Theunissen et al., 2014) et par l'inhibition de la PKC dans les milieux NHSM, *reset*, t2iLGö, PXGL et ENHSM (Figure 13 et Tableau 6) (Gafni et al., 2013; Takashima et al., 2014; Guo et al., 2017; Bredenkamp et al., 2019a). En plus de l'inhibition de la voie canonique FGF/MAPK, le milieu NHSM contient des inhibiteurs des voies MAPK non canoniques p38 et JNK (Figure 13 et Tableau 6) (Gafni et al., 2013). L'inhibition de p38 et JNK dans les ESC de souris soutient la pluripotence en augmentant le nombre de colonies pluripotentes et l'expression des gènes associés à la pluripotence (Yao et al., 2014; Tan et al., 2016). Comme dans le milieu 2iLIF murin, la voie Wnt est activée par l'inhibition de la GSK3 dans les milieux NHSM, 5i/L/A, L3i et t2iLGö (Figure 13 et Tableau 6) (Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Zimmerlin et al., 2016; Guo et al., 2017). En revanche, dans les milieux PXGL, ENHSM et 4CL l'inhibiteur de GSK3 est remplacé par un inhibiteur de Tankyrases (TNK) menant alors à une inhibition de la voie Wnt (Tableau 6) (Bredenkamp et al., 2019b; Bayerl et al., 2021; Mazid et al., 2022; Zimmerlin and Zambidis, 2020). Paradoxalement, dans le milieu L3i, l'inhibiteur des TNK agit en synergie avec l'inhibiteur de GSK3 connu pour activer la voie Wnt (Tableau 6) (Zimmerlin et al., 2016). En effet, les TNK active la voie Wnt en déstabilisant l'Axine ce qui empêche alors la dégradation de la bêta-caténine (Figure 13) (Kim et al., 2013). En plus d'agir sur la voie Wnt, les TNK sont impliquées dans l'inhibition de la voie Hippo. De ce fait, dans les hiPSC, l'inhibition des TNK active la voie Hippo en stabilisant AMOT ce qui induit l'inhibition par phosphorylation de YAP (Figure 13) (Dattani et al., 2022). Cette activation de la voie Hippo dans les hPSC maintient la pluripotence naïve et inhibe la différenciation en TE (Dattani et al., 2022).

L'ajout de facteurs remodelant la chromatine améliore la conversion vers l'état naïf de pluripotence (Ware et al., 2009). Dans le milieu 4CL, l'apposition de la marque épigénétique répressive H3K27me3 est inhibée par le DZNep pour améliorer la conversion des hPSC vers l'état naïf de pluripotence (Mazid et al., 2022). De plus, les méthodes t2iLGö et PXGL utilisent transitoirement l'acide valporique (VPA) pour inhiber les histones déacétylases (HDAC) impliquées dans l'apposition de marques répressives de la chromatine (Figure 13 et Tableau

6) (Guo et al., 2017; Bredenkamp et al., 2019a). Dans le milieu 4CL, l'inhibition des HDAC est continue (Mazid et al., 2022). De la même manière, chez la souris, l'inhibition des HDAC soutient l'auto-renouvellement et améliore la reprogrammation en iPSC (Ware et al., 2009). La vitamine C présente dans les milieux NHSM, ENHSM et 4CL active les enzymes TET induisant une déméthylation du génome des hPSC, le rendant plus permissif à la conversion vers l'état naïf de pluripotence (Figure 13 et Tableau 6) (Gafni et al., 2013; Bayerl et al., 2021; Mazid et al., 2022; Blaschke et al., 2013). En effet, chez la souris, la vitamine C améliore l'efficacité de reprogrammation des fibroblastes en iPSC (Esteban et al., 2010).

Contrairement aux ESC de souris, la voie Nodal/Activine est activée par l'ajout de ligand activine A/TGFB ou par la sécrétion d'activine A dans le milieu de culture par les cellules nourricières (Figure 13 et Tableau 6) (Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Zimmerlin et al., 2016; Guo et al., 2017; Bredenkamp et al., 2019a; Hu et al., 2020; Bayerl et al., 2021; Mazid et al., 2022). L'activation de la voie Nodal/Activine est nécessaire à l'auto-renouvellement des PSC (Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Zimmerlin et al., 2016; Guo et al., 2017; Bredenkamp et al., 2019a; Hu et al., 2020; Bayerl et al., 2021; Mazid et al., 2022).

En somme, l'activation de la voie LIF/STAT3, Nodal/Activine et l'inhibition des voies FGF/MAPK, MAPK non-canonique p38 et JNK sont impliquées dans le maintien des PSC pseudo-naïves *in vitro* chez l'Homme.

Chez les primates non-humains il est possible de convertir vers l'état naïf de pluripotence les PSC conventionnelles en utilisant les méthodes établies pour les hPSC humaines NHSM, TL2i, t2iLGö ou 4CL (Aksoy et al., 2021; Chen et al., 2015b; Cao et al., 2023). Des milieux de conversion tel que NHSMv ou le 4i/L/b ont directement été établis chez les primates non-humains pour convertir les PSC vers l'état naïf de pluripotence (Chen et al., 2015b; Fang et al., 2014). La méthode NHSMv est modifiée d'après le milieu NHSM (Chen et al., 2015b). En effet, l'inhibiteur de PKC utilisé dans le milieu NHSM est remplacé par un deuxième inhibiteur de la voie MAPK non-canonique p38 dans le milieu NHSMv (Tableau 6) (Chen et al., 2015b). Le milieu 4i/L/b est un milieu 2iLIF auquel est ajouté des inhibiteurs des voies MAPK non-canoniques p38 et JNK ainsi que du FGF2 permettant la sécrétion d'activine A par les cellules nourricières (Tableau 6) (Fang et al., 2014).

Comme chez l'Homme, l'activation de la voie LIF/STAT3, Nodal/Activine et l'inhibition des voies FGF/MAPK, MAPK non-canonique p38 et JNK permettent le maintien des PSC pseudo-naïves *in vitro* chez les primates non-humains.

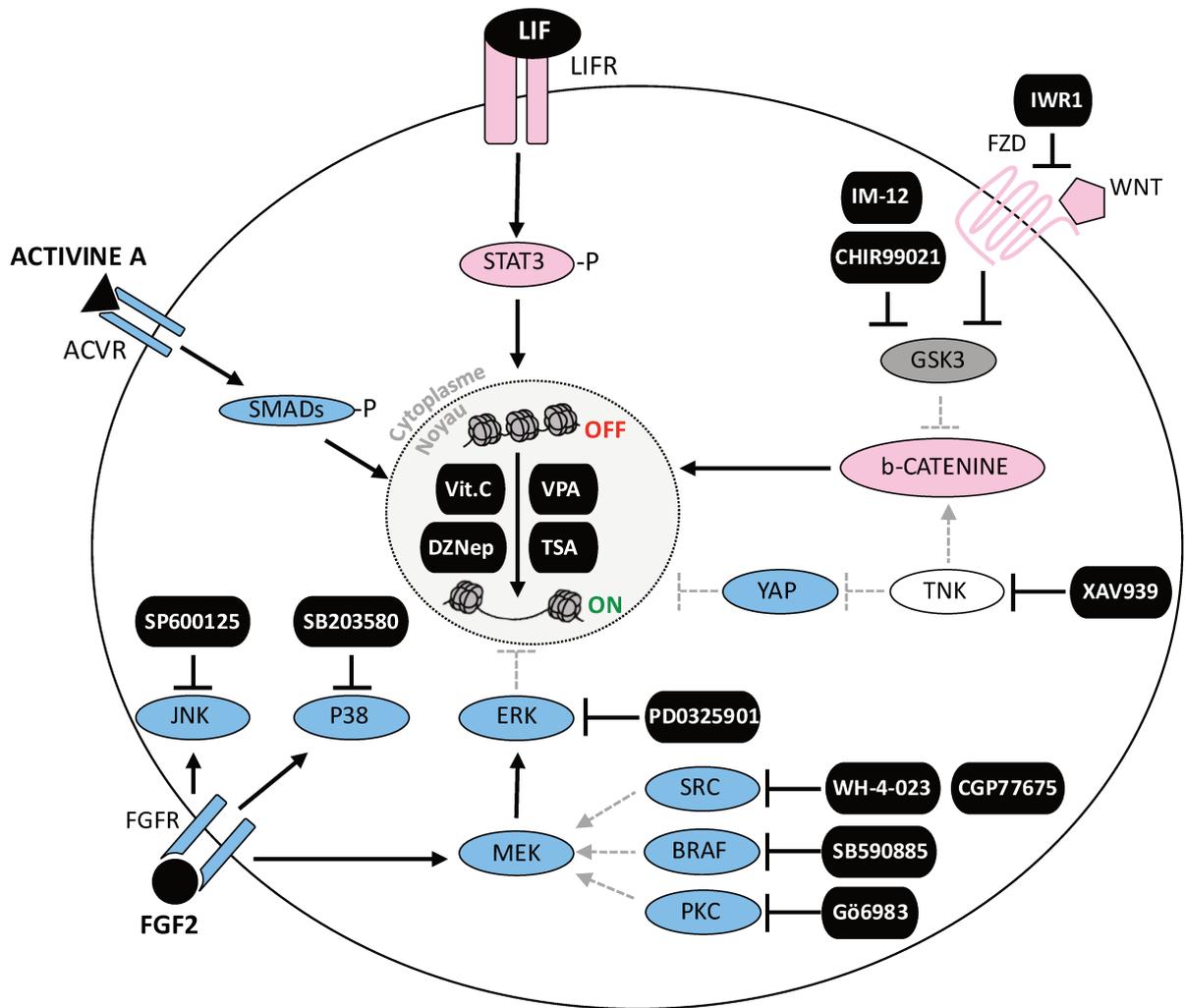


Figure 13 : Facteurs extrinsèques et voies de signalisation régulant la pluripotence naïve chez les primates.

Schéma représentant les facteurs extrinsèques et voies de signalisation régulant la pluripotence naïve chez les primates humains et non-humains. Les flèches noires représentent les activations. Les flèches dont la pointe est aplatie représentent les inhibitions. Les flèches grises représentent les activations et inhibitions contournées par les facteurs extrinsèques.

		NHSM (Gafni et al. 2013)	reset (Takashima et al. 2014)	5i/L/A (Theunissen et al. 2014)	TL2i (Chen et al. 2015)	L3i (Zimmerlin et al. 2016)	t2iLGö (Guo et al. 2017)	PXGL (Bredenkamp et al. 2019)	HNSM (Bayerl et al. 2021)	4CL (Mazid et al. 2022)	NHSMV (Chen et al. 2015b)	4i/L/b (Fang et al. 2014)
Transgènes		-	NANOG + KLF2*	-	STAT3*	-	-	-	-	-	-	-
Facteurs de croissance	LIF	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	FGF2	X									X	X
	ACTIVINE A	^{TGFβ} X		X						X	^{TGFβ} X	
	Cellules nourricières	X	X	X	X	X	X	X			X	X
Inhibiteurs	MEKi (PD0325901)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	GSK3i (CHIR99021)	X	X	X	X	X	X				X	X
	WNTi (IWR1)									X		
	TNKi (XAV939)					X		X	X			
	PKCi (Gö6983)	X	X				X	X	X			
	JNKi (SP600125)	X		^{6i/L/A} X								X
	P38i (SB203580)	X									X	X
	BRAFi (SB590885)			X								
	SRCi (WH-4-023, CGP77675)			^{WH-4-023} X					^{CGP77675} X			
Facteurs remodelant la chromatine	HDACi (VPA, TSA)						^{VPA} X*	^{VPA} X*		^{TSA} X		
	Vitamine C	X*							X	X	X	
	DZNep									X		

Tableau 6 : Composition des différents milieux de conversion vers l'état naïf de pluripotence des PSC de primates.

Les croix représentent la présence du composé ou transgène dans le méthode de conversion nommée dans les colonnes et les étoiles (*) indiquent un traitement ou une activation transitoire.

2.3.2. Pluripotence naïve chez les primates

2.3.2.1. Dépendance au LIF

Les cellules de l'EPI d'embryons pré-implantatoires humains et de macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) expriment des gènes codant des effecteurs de la voie LIF/STAT3 comme *IL6R*, *IL6ST*, *STAT3* et des cibles transcriptionnelles de STAT3 comme *KLF4* ou *TFCP1L1* (Bourillot et al., 2020, 2009; Meistermann et al., 2021; Stirparo et al., 2018; Nakamura et al., 2016). De plus, le récepteur au LIF est exprimé par les cellules de l'EPI, du PrE et de TE dans l'embryon pré-implantatoire humain (Bourillot et al., 2020; Meistermann et al., 2021). Ces données suggèrent une activation de la voie LIF/STAT3 dans les cellules de l'EPI pré-implantatoire chez les primates (Bourillot et al., 2020). Cependant, les cellules de l'EPI pré-implantatoire chez l'Homme et le macaque cynomolgus expriment peu, voire pas le LIF, rendant discutable le rôle du LIF dans l'activation de STAT3 (Bourillot et al., 2020; Meistermann et al., 2021; Nakamura et al., 2016). *In vitro*, l'auto-renouvellement des hPSC pseudo-naïves dépend du LIF qui induit la phosphorylation de STAT3 et l'expression de ses cibles transcriptionnelles (Gafni et al., 2013; Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014; Zimmerlin et al., 2016; Guo et al., 2017; Bredenkamp et al., 2019a; Bayerl et al., 2021). Ainsi, le LIF est nécessaire au maintien de la pluripotence naïve chez les primates mais les mécanismes sous-jacents sont encore mal élucidés (Figure 14).

2.3.2.2. Dépendance de la voie NODAL

L'auto-renouvellement des hPSC pseudo-naïves dépendent de la voie Nodal/Activine (Gafni et al., 2013; Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014; Zimmerlin et al., 2016; Guo et al., 2017; Bredenkamp et al., 2019a; Bayerl et al., 2021). *In vivo*, l'inhibition de la voie Nodal/Activine sur des embryons pré-implantatoires humains provoque une diminution du nombre de cellules pluripotentes de l'EPI (Blakeley et al., 2015). En revanche, l'inhibition de la voie Nodal/Activine dans des embryons humains a l'effet l'inverse (Van Der Jeught et al., 2014). De plus, Boroviak *et al.* ont montré aucun effet de l'inhibition de la voie Nodal/Activine sur l'embryon pré-implantatoire de marmoset (*Callithrix jacchus*) (Boroviak et al., 2015). Ces résultats opposés ne permettent pas de conclure sur l'implication de la voie Nodal/Activine dans le maintien de la pluripotence naïve *in vivo* (Figure 14).

2.3.2.3. Indépendance de la voie MAPK

Les hPSC pseudo-naïves, comme les mESC, sont indépendantes de la voie FGF/MAPK et s'auto-renouvellent en présence d'inhibiteur de FGF/MAPK (partie 2.3.1.2). Dans l'embryon de marmoset et l'embryon humain, l'inhibition de la voie FGF/MAPK induit une augmentation du nombre de cellules pluripotentes de l'EPI (Roode et al., 2012; Boroviak et al., 2015). Ainsi, l'indépendance de la voie MAPK, comme chez la souris, est aussi une caractéristique de la pluripotence naïve chez les primates (Figure 14).

2.3.2.4. Facteurs de transcription associés à la pluripotence naïve chez les primates

Les gènes du noyau de pluripotence *POU5F1*, *SOX2* et *NANOG* sont très conservés parmi les mammifères et sont exprimés dans les cellules de l'EPI des embryons humains et de primates non-humains (Figure 14) comme dans l'embryon de souris (Blakeley et al., 2015; Boroviak et al., 2015; Petropoulos et al., 2016; Nakamura et al., 2016; Stirparo et al., 2018). En plus des gènes du noyau de pluripotence, les cellules de l'EPI de blastocystes de primates expriment des facteurs de transcription spécifiques de la pluripotence naïve décrits chez la souris tels que *KLF4*, *KLF5*, *TFCP2L1* et *TBX3* (Blakeley et al., 2015; Boroviak et al., 2015; Nakamura et al., 2016; Stirparo et al., 2018). En revanche, les cellules de l'EPI d'embryons pré-implantatoires de primates n'expriment ni *ESRRB*, ni *KLF2* (Blakeley et al., 2015; Boroviak et al., 2015; Nakamura et al., 2016; Stirparo et al., 2018). Ces cellules de l'EPI pré-implantatoire de primates sont caractérisées par l'expression spécifiques de gènes tel que *KLF17*, *TFAP2C*, *ARGFX*, *DNMT3L* et *GDF3* (Figure 14) (Blakeley et al., 2015; Petropoulos et al., 2016; Nakamura et al., 2016; Stirparo et al., 2018; Pastor et al., 2018; Meistermann et al., 2021). Ces gènes ne sont pas impliqués dans le maintien de la pluripotence naïve chez la souris (Blakeley et al., 2015; Petropoulos et al., 2016; Nakamura et al., 2016; Stirparo et al., 2018; Pastor et al., 2018; Meistermann et al., 2021). Les hPSC pseudo-naïves, contrairement aux hPSC conventionnelles, expriment certains gènes associés à la pluripotence naïve tel que *KLF17*, *TFCP2L1*, *DNMT3L*, *KLF4* et *TBX3* (Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Takashima et al., 2014; Chen et al., 2015a; Zimmerlin et al., 2016; Guo et al., 2017; Bredenkamp et al., 2019b; Bayerl et al., 2021).

2.3.2.5. Métabolisme

Chez la souris, les ESC ont un métabolisme énergétique bivalent alors que celui des EpiSC est basé sur la glycolyse (Zhou et al., 2012). Les hESC, comme les EpiSC chez la souris, ont une faible activité mitochondriale et une activité glycolytique élevée par (Zhou et al., 2012). De plus, les hESC ne survivent pas à l'inhibition de la glycolyse (Zhou et al., 2012). Ainsi, le métabolisme énergétique des hESC conventionnelles repose sur la glycolyse. Après conversion vers l'état naif de pluripotence, certaines hPSC pseudo-naïves augmentent l'OXPPOS par rapport aux hPSC conventionnelles (Takashima et al., 2014; Bayerl et al., 2021). Ceci suggère une bivalence métabolique des hPSC pseudo-naïve comme c'est le cas pour les ESC de souris (Figure 14).

2.3.2.6. Epigénome

Chez l'Homme comme chez la souris, l'ADN des embryons pré-implantatoires est globalement hypométhylé (Smith et al., 2014). Comme nous l'avons vu précédemment (2.1.2.6), cette caractéristique est maintenue dans les ESC de souris en culture. De la même manière, les hPSC pseudo-naïves ont un génome globalement hypométhylé (Figure 14) (Pastor et al., 2016; Theunissen et al., 2016; Gafni et al., 2013; Takashima et al., 2014; Chen et al., 2015a; Guo et al., 2017; Zimmerlin et al., 2016; Bredenkamp et al., 2019b; Bayerl et al., 2021). En revanche, comme c'est le cas pour les EpiSC de souris, l'ADN des hPSC conventionnelles est hyperméthylé (Pastor et al., 2016).

2.3.2.7. Inactivation du chromosome X

Les cellules de l'EPI du blastocyste humain femelle se caractérisent par l'activité transcriptionnelle des deux chromosomes X (Petropoulos et al., 2016). Contrairement à l'embryon de souris, le long ARN non-codant *XIST* est exprimé dès le stade 4-cellules et recouvre les deux chromosomes X sans pour autant les inactiver (Briggs et al., 2015; Vallot et al., 2017). En effet, dans les cellules de l'EPI du blastocyste humain la présence du *XIST* n'est pas associée à la marque épigénétique répressive H3K27me3 (Okamoto et al., 2011). L'activation des chromosomes X, en présence du *XIST* chez l'Homme, implique un second long ARN non-codant, le *X active coating transcript (XACT)* (Vallot et al., 2013). Ce long ARN non-codant est exprimé par les cellules de l'embryon pré-implantatoire humain dès le stade 4-cellules (Vallot et al., 2017). Dans les cellules de l'EPI du blastocyste humain, *XACT* recouvre les deux chromosomes X actifs de la même manière que *XIST* (Vallot et al., 2017).

Dans les lignées de hPSC conventionnelles femelles, l'un des deux chromosomes X est inactivé (Vallot et al., 2017). Comme dans les cellules différenciées, les hPSC conventionnelles n'expriment pas *XACT* et le chromosome X inactif est recouvert par *XIST* entraînant l'apposition de la marque épigénétique répressive H3K27me3 (Vallot et al., 2013, 2017). Lors de la conversion des hPSC vers l'état naïf de pluripotence, le second chromosome X est réactivé (Figure 14) (Vallot et al., 2017). Comme dans les cellules de l'EPI du blastocyste humain, les hPSC pseudo-naïves expriment *XIST* et *XACT*, lesquels recouvrent les deux chromosomes X pour les maintenir actifs (Figure 14) (Vallot et al., 2017).

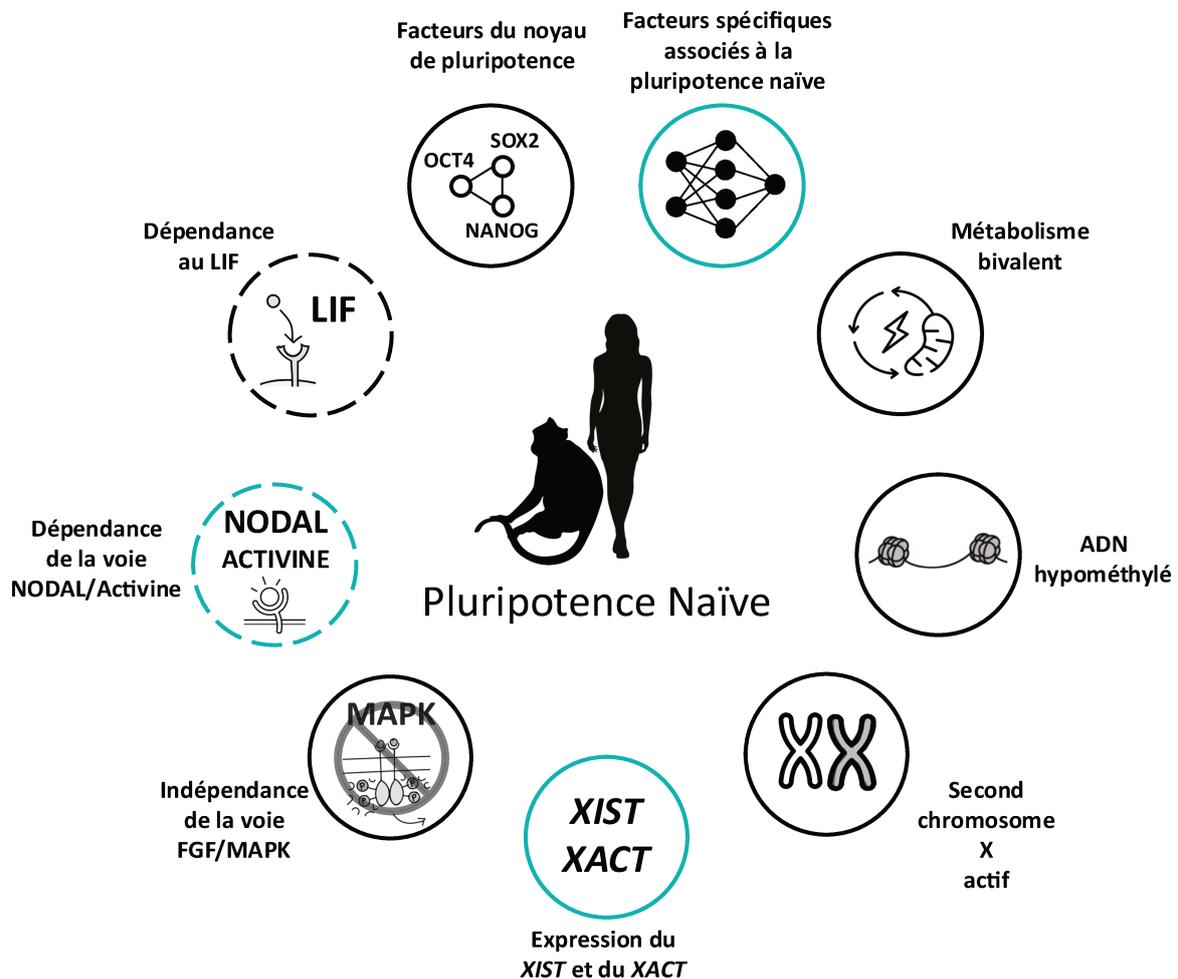


Figure 14 : Caractéristiques de la pluripotence naïve chez les primates.

Schéma récapitulant les caractéristiques de la pluripotence naïve *in vivo* et *in vitro* chez les primates. Les cercles noirs représentent les caractéristiques communes à la pluripotence naïve chez les rongeurs et les primates. Les cercles turquoise représentent les caractéristiques spécifiques à la pluripotence naïve chez les primates. Les cercles pointillés représentent les caractéristiques, encore discutées, de la pluripotence naïve chez les primates.

2.3.3. Pluripotence formative chez les primates

En 2021, Kinoshita *et al.* ont élaboré un milieu de culture permettant la stabilisation des PSC de souris à l'état formatif de pluripotence (Kinoshita et al., 2021). Ce milieu, contenant de l'activine A en faible concentration et un inhibiteur des tankyrases, permet aussi de convertir les hPSC pseudo-naïves ou hPSC conventionnelles dans l'état formatif de pluripotence. Ces cellules sont alors appelées hFS (Kinoshita et al., 2021). La même année, Yu *et al.* ont établi des cellules de souris qu'ils ont appelées FTW-PSC dans un milieu contenant du Fgf2, de l'activine A et le ligand Wnt3a (Yu et al., 2021). Ce milieu permet également la conversion des hPSC conventionnelles vers l'état formatif de pluripotence. Ces cellules sont appelées hPSC-FTW (Yu et al., 2021). Le transcriptome des hFS est proche de celui des cellules de l'EPI post-implantatoire précoce de macaque cynomolgus, alors que le transcriptome des hPSC-FTW est proche du transcriptome des cellules de l'EPI post-implantatoire précoce humain à E8 (Kinoshita et al., 2021; Yu et al., 2021). Les hFS et hPSC-FTW expriment les gènes associés à la pluripotence naïve comme *KLF4*, *KLF17*, *SUSD2* et *TFCP2L1* à des niveaux des faibles. Elles n'expriment pas les marqueurs de la ligne primitive associés à la pluripotence amorcée *TBXT* et *FOXA2* (Kinoshita et al., 2021; Yu et al., 2021). En revanche, les hFS et hPSC-FTW expriment des gènes associés à la pluripotence formative *OTX2* et *SOX11* (Kinoshita et al., 2021; Yu et al., 2021). Les hPSC-FTW peuvent s'engager dans la différenciation en PGC comme les PSC de souris dans l'état formatif de pluripotence (Yu et al., 2021).

Ainsi, chez l'Homme comme chez la souris, il est possible de capturer *in vitro* différents états de pluripotence formative reflétant les cellules de l'EPI post-implantatoire précoce.

2.3.4. Capacité de colonisation des PSC de primates

2.3.4.1. Chimères intra-espèces

Les PSC de PNH, à l'état amorcé ou pseudo-naïf de pluripotence, sont incapables de produire efficacement des chimères après injection dans des embryons pré-implantatoires de la même espèce (Tableau 7) (Tachibana et al., 2012; Chen et al., 2015b). En 2023, Cao *et al.* ont obtenu, après injection d'ESC, le premier nouveau-né chimère chez le macaque cynomolgus (Cao et al., 2023). Les ESC de macaques ont été convertis vers l'état naïf de pluripotence grâce au milieu 4CL et, après injection dans des morulas de macaques, ont abouti à la production de 73% de gastrula colonisées (Cao et al., 2023). 72h après l'injection, les ESC pseudo-naïves de macaques ont contribué à l'ICM et au TE (Cao et al., 2023). Avant sa conversion vers l'état naïf de pluripotence, la lignée d'ESC de macaque produisaient déjà des

chimères par injection dans des morulas de macaque (Cao et al., 2023). Ceci suggère que le milieu de conversion 4CL a renforcé une compétence chimérique intrinsèque à la lignée d'ESC de macaque cynomolgus utilisé dans ces travaux.

Les transferts des blastocystes colonisés par les ESC pseudo-naïves de macaque dans l'utérus des mères porteuses a donné naissance à six petits viables, parmi lesquels un seul est chimérique (Cao et al., 2023). La contribution des ESC pseudo-naïves de macaque est importante et varie de 21 à 92% selon les organes considérés (Cao et al., 2023). Les ESC pseudo-naïves ont contribué au développement d'organes issus des trois feuillets embryonnaires, tel que le cerveau, le cœur, les poumons, les reins, le foie, le jéjunum, l'iléum ou le rectum (Cao et al., 2023). Cependant, le petit macaque chimère a dû être euthanasié 10 jours après sa naissance à cause de troubles respiratoires sévères (Cao et al., 2023). Quatre fœtus avortés ont été également décrits dans cette étude, parmi lesquels un était fortement colonisé par les ESC pseudo-naïves (Cao et al., 2023). Ces résultats suggèrent que les ESC-pseudo-naïves de macaque ont pu coloniser, à des stades très tardifs, des fœtus de macaque mais ne permettent pas d'obtenir des individus viables sur le long terme comme c'est le cas chez la souris.

Tous ces travaux montrent que les PSC de primates ne peuvent pas produire des individus chimères intra- et inter-espèces viables comme c'est le cas avec les ESC de souris. Il existe également un manque de répétabilité et une forte variabilité dans ces travaux de formations de chimères. Cependant, les primates ne sont pas dépourvu de cette capacité à produire des chimères puisqu'il est possible d'obtenir des nouveau-nés chimériques viables après l'agrégation d'embryons 4-cellules chez le macaque rhésus (Tachibana et al., 2012).

PSC (état de pluripotence)	Stade de l'embryon hôte (espèce)	Chimères pré-implantatoires	Chimères fœtales	Chimères à la naissance	Contribution à l'embryon hôte	Références
cynomolgus PSC 4CL (pseudo-naïf)	morula (cynomolgus)	-	73% (8/11 gastrula)	17% (1/6 petits vivants)	Importante	(Cao et al., 2023)
cynomolgus PSC NHSMv (pseudo-naïf)	morula (cynomolgus)	63% (21/33 gastrula)	100% (2/2 fœtus)	-	Faible	(Chen et al., 2015b)
cynomolgus PSC (amorcé)	morula (cynomolgus)	-	43% (3/7 gastrula)	-	-	(Cao et al., 2023)
rhesus PSC (amorcé)	blastocyste (rhesus)	-	0%	-	-	(Tachibana et al., 2012)

0% : absent / ≤25% : faible / 26-50% : moyen à faible / 51-60% : moyen à fort / >60% : élevé

Tableau 7 : Capacité de colonisation des différentes lignées de PSC de primates après injection dans des embryons pré-implantatoires précoces de la même espèce.

2.3.4.2. Chimères inter-espèces

Chez la souris, les EpiSC, qui sont dans l'état amorcé de pluripotence, ne forment pas de chimères après injection dans un embryon pré-implantatoire de souris (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Les PSC de primates conventionnelles, qui sont également dans l'état amorcé de pluripotence, ne forment pas de chimères après injection dans des embryons pré-implantatoires de souris, de porc, de lapin ou d'une autre espèce de primates (Tableau 8) (Simerly et al., 2011; Takashima et al., 2014; Fang et al., 2014; Masaki et al., 2015; Wu et al., 2017; Huang et al., 2018; Aksoy et al., 2021; Mazid et al., 2022). En revanche, comme les EpiSC, elles peuvent coloniser les embryons post-implantatoires de souris à E6.5-7.5 (Mascetti and Pedersen, 2016).

D'autre part, les PSC de primates pseudo-naïves NHSM, 5i/L/A, *reset*, ENHSM et 4CL ne produisent pas de chimère après injection dans des embryons pré-implantatoires de souris (Tableau 8) (Gafni et al., 2013; Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014; Masaki et al., 2015; Theunissen et al., 2016; Huang et al., 2018; Bayerl et al., 2021; Mazid et al., 2022). L'injection de PSC de primates pseudo-naïves ou formatives dans des embryons pré-implantatoires de lapin ou de porc produit des blastocystes chimères avec une efficacité moyenne (Tableau 8) (Aksoy et al., 2021; Wu et al., 2017). Cependant, malgré le pourcentage moyen de blastocystes colonisés (30-40%), ces derniers contiennent peu de cellules dérivant des PSC injectées (Aksoy et al., 2021; Wu et al., 2017). Ceci contraste avec la forte contribution

des ESC de souris au développement de l'embryon après leur injection dans un embryon pré-implantatoire de souris ou de lapin (Beddington and Robertson, 1989; Aksoy et al., 2021). De plus, l'efficacité de production de chimères des PSC pseudo-naïves ou formatives, injectées dans des embryons de porc ou de lapin, chute drastiquement après l'implantation (Tableau 8) (Aksoy et al., 2021; Wu et al., 2017). Cette faible compétence des PSC de primates pseudo-naïves à coloniser les embryons pré-implantatoires pourrait s'expliquer par la distance évolutive importante séparant les primates de la souris (dernier ancêtre commun datant d'il y a 87 millions d'années : <https://timetree.org/>), du lapin (dernier ancêtre commun datant d'il y a 87 millions d'années : <https://timetree.org/>) ou du porc (dernier ancêtre commun datant d'il y a 94 millions d'années : <https://timetree.org/>). Cependant, l'injection de hPSC dans des embryons de macaque cynomolgus, évolutivement plus proche (dernier ancêtre commun datant d'il y a 28.8 millions d'années : <https://timetree.org/>) ne produit que ~20% de blastocystes chimériques avec une très faible contribution des PSC injectées à l'embryon hôte (Tableau 8) (Aksoy et al., 2021). Ceci suggère que les PSC de primates pseudo-naïves ne peuvent pas produire de chimères après injection dans un embryon pré-implantatoire d'une autre espèce indépendamment de sa proximité évolutive.

La capacité de colonisation des embryons pré-implantatoires varie en fonction des lignées de PSC de primates pseudo-naïves. En effet, deux lignées différentes de hiPSC pseudo-naïves *reset* injectées dans des blastocystes de souris produisent 28% de blastocystes tardifs chimériques chez Takashima *et al.* et seulement 9% chez Masaki *et al.* (Tableau 8) (Takashima et al., 2014; Masaki et al., 2015). De plus, le milieu de conversion vers l'état naïf impacte cette capacité de colonisation. Par exemple, les hiPSC TL2i colonisent 13% des morulas de macaques cynomolgus alors que la même lignée de hiPSC cultivée en t2iLGö colonisent 29% des morulas de macaque cynomolgus trois jours après injection (Tableau 8) (Aksoy et al., 2021). L'injection de la même lignée de hESC pseudo-naïve NHSM dans des morulas de souris par Gafni *et al.* et par Theunissen *et al.* a produit respectivement 6% et 0% de fœtus chimères (Tableau 8) (Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014, 2016). Ceci illustre une variabilité due à l'interprétation du chimérisme par les auteurs. En effet, en plus du taux de chimères produites il faut également tenir compte du nombre de cellules dérivées des PSC injectées. Enfin, au-delà de la présence des cellules dérivant des PSC injectées, il faut que celles-ci se différencient en harmonie avec les cellules de l'embryon hôte et participent au développement normal de l'embryon comme c'est le cas chez la souris.

PSC (état de pluripotence)	Stade de l'embryon hôte (espèce)	Chimères pré-implantatoires	Chimères fœtales	Contribution à l'embryon hôte	Références
hPSC NHSM (pseudo-naïf)	morula (souris)	-	2%	-	(Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014, 2016)
	blastocyste (porc)	43%	20%	Faible	(Wu et al., 2017)
hPSC 5i/L/A (pseudo-naïf)	morula-blastocyste (souris)	-	1%	-	(Theunissen et al., 2014, 2016; Huang et al., 2018)
hPSC reset (pseudo-naïf)	morula-blastocystes (souris)	18%	1%	-	(Theunissen et al., 2016; Takashima et al., 2014; Masaki et al., 2015; Huang et al., 2018)
	blastocyste (porc)	37%	23%	Faible	(Wu et al., 2017)
hPSC HENSM (pseudo-naïf)	morula (souris)	-	3%	Faible	(Bayerl et al., 2021)
hPSC 4CL (pseudo-naïf)	8-cellules (souris)	93%	15%	-	(Mazid et al., 2022)
hPSC t2iLGö (pseudo-naïf)	morula (lapin)	28%	-	Faible	(Aksoy et al., 2021)
	morula (cynomolgus)	13%	-	Faible	(Aksoy et al., 2021)
hPSC TL2i (pseudo-naïf)	morula (lapin)	25%	-	Faible	(Aksoy et al., 2021)
	morula (cynomolgus)	29%	-	Faible	(Aksoy et al., 2021)
rhesus PSC TL2i (pseudo-naïf)	morula (lapin)	39%	0%	Faible	(Aksoy et al., 2021)
	morula (cynomolgus)	29%	-	Faible	(Aksoy et al., 2021)
hPSC FTW (formatif)	blastocyste (porc)	31%	15%	Faible	(Wu et al., 2017)
hPSC (amorcé)	morula-blastocyste (souris)	2%	0%	-	(Takashima et al., 2014; Masaki et al., 2015; Mazid et al., 2022; Huang et al., 2018)
	blastocyste (porc)	0%	-	-	(Wu et al., 2017)
rhesus PSC (amorcé)	blastocyste (souris)	-	0%	-	(Fang et al., 2014; Simerly et al., 2011)
	morula (lapin)	0%	-	-	(Aksoy et al., 2021)

0% : absent / ≤25% : faible / 26-50% : moyen à faible / 51-60% : moyen à fort / >60% : élevé

Tableau 8 : Capacité de colonisation de différentes lignées de PSC de primates après injection dans des embryons pré-implantatoires précoces d'autres espèces.

Données détaillées dans le tableau S3 des annexes.

3. Enseignements tirés des chimères chez les mammifères

La difficulté à produire des chimères par injection de PSC dans des embryons pré-implantatoire chez les espèces de mammifères autres que les rongeurs questionne les mécanismes et barrières impliqués dans la capacité de colonisation des PSC.

3.1. L'équivalence développementale

Pour former des chimères, les PSC injectées doivent respecter le principe d'équivalence développementale (Figure 15). Ce principe consiste à injecter des PSC dans un état de pluripotence correspondant à celui des cellules de l'embryon hôte. Comme décrit dans la partie 2.1.4.1, les ESC de souris, équivalent *in vitro* des cellules de l'EPI pré-implantatoire, colonisent efficacement les embryons pré-implantatoires et produisent des individus chimères viables. En revanche, les EpiSC colonisent uniquement l'EPI d'embryons post-implantatoires à E7.5 dont elles sont l'équivalent *in vitro* (Huang et al., 2012; Kojima et al., 2014). De la même manière, les PSC de primates à l'état amorcé de pluripotence colonisent l'EPI post-implantatoires des embryons de souris. De plus, les PSC pseudo-naïves de primates ne colonisent pas non plus les embryons pré-implantatoires de mammifères et, en 2021, Aksoy *et al.* ont montré qu'elles se différenciaient prématurément après leur injection dans des embryons pré-implantatoires (Aksoy et al., 2021). Ceci suggère un défaut d'équivalence développementale entre PSC de primates pseudo-naïves et embryons pré-implantatoires. En effet, contrairement aux ESC de souris, ces PSC pseudo-naïves ne reflètent pas strictement l'état naïf de pluripotence tel qu'il existe *in vivo*. Les PSC pseudo-naïves ne sont donc pas l'équivalent *in vitro* de l'EPI pré-implantatoire, ce qui pourrait expliquer pourquoi les PSC pseudo-naïves de primates ne colonisent pas efficacement les embryon pré-implantatoires.

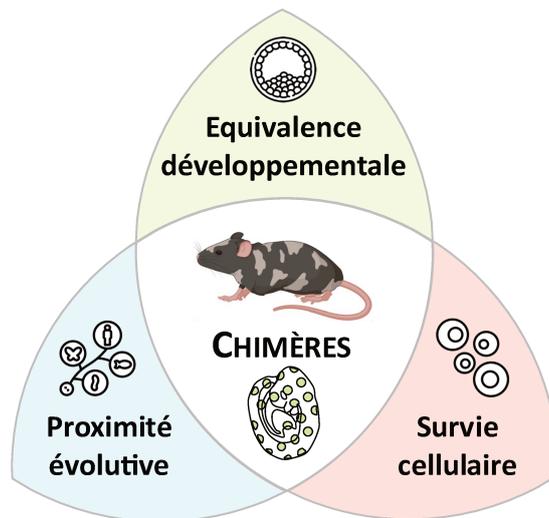


Figure 15 : Prérequis connus pour la formation de chimères.

Schéma représentant les mécanismes connus pour leur implication dans la formation de chimères : la proximité évolutive entre l’hôte et les PSC injectées ; l’équivalence développementale entre l’hôte et les PSC injectées ; et la survie des PSC dans l’hôte après leur injection.

3.2. La proximité évolutive

Comme développé dans la partie 2.1.4.2, la capacité des PSC de rongeurs à coloniser un embryon est impactée par la distance évolutive entre l’espèce des PSC injectée et l’espèce de l’embryon hôte (Figure 15). En effet, les ESC de souris colonisent difficilement les embryons pré-implantatoires d’espèces hôtes évolutivement plus distantes, comme le porc, que d’hôtes évolutivement plus proches comme le mulot sylvestre (Wu et al., 2017; Xiang et al., 2008). De ce fait, il semble logique que les PSC pseudo-naïves de primates injectées dans des embryons pré-implantatoires de souris produisent moins efficacement des chimères que lors de l’injection de PSC de macaque cynomolgus dans des embryons pré-implantatoire de la même espèce. Ainsi, la faible capacité de production de chimères des PSC pseudo-naïves chez le primate pourrait aussi s’expliquer par la distance phylogénétique importante séparant les espèces de l’embryon hôte et des PSC injectés.

3.3. La survie cellulaire

3.3.1. Apoptose

Lors de l'injection de cellules EpiSC dans des blastocystes de souris, les cellules entrent en apoptose dans les 24h suivant l'injection ce qui explique leur incapacité à coloniser l'embryon pré-implantatoire (Masaki et al., 2016). La surexpression de facteurs anti-apoptotiques tel que *Bcl2* ou *Bcl-xl* dans les EpiSC permet d'obtenir des individus chimères après injection dans les embryons pré-implantatoires (Masaki et al., 2016). De la même manière, la surexpression de l'anti-apoptotique *BMI1* dans les hPSC conventionnelles et pseudo-naïves les rend capables de coloniser des embryons pré-implantatoires de souris (Huang et al., 2018).

En 2021, Aksoy *et al.* ont montré qu'après injection de PSC de primates pseudo-naïves dans des embryons pré-implantatoires de lapin, ces dernières se différencient prématurément et entraînent en apoptose (Aksoy et al., 2021). La surexpression de l'anti-apoptotique *BCL2* dans ces PSC de primate, les rendait alors capable de coloniser les embryons pré-implantatoires mais n'empêchait pas leur différenciation prématurée (Aksoy et al., 2021). Ainsi, l'apoptose est une barrière à la colonisation des embryons par les PSC (Figure 15).

3.3.2. Compétition cellulaire

La compétition cellulaire est un mécanisme assurant l'intégrité génétique et l'homéostasie tissulaire au cours du développement. C'est un mécanisme de sélection naturelle dans lequel les cellules les plus aptes induisent l'élimination des cellules les moins aptes (Amoyel and Bach, 2014). Dans l'embryon de souris, il existe deux vagues de compétition cellulaire. La première a lieu lors de la formation de l'EPI dans les blastocystes à E4.5. Les cellules d'ICM dont l'identité est mal spécifiée entre PrE et EPI sont alors éliminées par apoptose (Hashimoto and Sasaki, 2019). De la même manière, les cellules engagées prématurément dans la différenciation, et ne respectant pas l'équivalence développementale, semblent être éliminées par apoptose (Alexandrova et al., 2015). Ce mécanisme de compétition cellulaires peut expliquer l'apoptose induite dans les PSC de primates pseudo-naïves durant les 24 à 72 heures suivant leur injection dans des embryons pré-implantatoires de souris, de lapin ou de macaque (Huang et al., 2018; Aksoy et al., 2021). Une seconde vague de compétition cellulaire a lieu dans l'EPI à E6.0-6.5 lors de la sortie de la pluripotence formative. C'est à ce moment que les cellules aneuploïdes ou les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondriaux sont éliminées par apoptose (Sancho et al., 2013; Lima et al., 2021). Ce processus de

compétition cellulaire dans l'EPI d'embryons post-implantatoires peut expliquer la très forte diminution de chimérisme dans les fœtus lors de l'injection de PSC pseudo-naïves de primates dans des embryons pré-implantatoires. Ainsi, la survie des PSC dans un environnement compétitif tel que l'embryon est essentiel pour la production de chimères.

4. Projet de thèse

Nos connaissances des mécanismes impliqués dans la formation d'embryons chimères avec des PSC sont limitées. Mon projet avait pour objectif de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la capacité des PSC à coloniser l'embryon pré-implantatoire. Nous avons choisi d'utiliser l'embryon de lapin comme embryon hôte car son développement suit des étapes similaires à celui des primates. Nous avons ensuite utilisé différentes lignées cellulaires de PSC de lapin pour étudier le chimérisme intra-spécifique, mais également des lignées de PSC de primates pour étudier le chimérisme inter-spécifique. Nous avons aussi utilisé des PSC de souris comme référence car elles sont, à l'heure actuelle, les seules PSC connues pour produire des individus chimères viables avec transmission germinale, après injection dans un embryon de souris hôte.

Dans un premier temps, nous avons séquencé et comparé le transcriptome de différentes lignées de PSC de lapin, capables ou non de coloniser l'embryon de lapin. Nous avons fait de même chez les primates et la souris. Ces analyses avaient pour objectif d'identifier les déterminants moléculaires communs et spécifiques impliqués dans la capacité de colonisation des PSC de souris, de lapin et de primates.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé un séquençage ARN sur cellule unique d'embryons de lapin chimériques, colonisés par des PSC de primates et de souris. Nous voulions identifier les changements transcriptomiques survenant aux seins des PSC injectées, mais également au sein des cellules de l'embryon hôte lors de la colonisation. L'objectif de cette deuxième analyse était de mettre en lumière les déterminants moléculaires nécessaires à la colonisation par des PSC de primates et de souris.

*

* *

Résultats

1. Signature transcriptomique des PSC capables de coloniser l'embryon pré-implantatoire

Dans la première partie de ma thèse, j'ai cherché à identifier les **gènes impliqués dans la compétence chimérique des PSC**. Dans ce but, j'ai comparé le transcriptome de PSC capables de coloniser l'embryon pré-implantatoire dans différentes espèces : le lapin, les primates et la souris.

1.1. Chez le lapin

Je me suis intéressée aux caractéristiques spécifiques des PSC de **lapin** capables de coloniser l'embryon de lapin. Dans notre laboratoire, l'équipe a développé une méthode de reprogrammation des rbiPSC conventionnelles vers l'état naïf de pluripotence les rendant capable de coloniser l'embryon pré-implantatoire de lapin ([Annexes - Article 1](#)). J'ai analysé le transcriptome de chaque lignée et identifié la signature transcriptomique des PSC de lapin qui sont compétentes pour la colonisation.

1.1.1. Initiation de la reprogrammation vers l'état naïf de pluripotence grâce à la condition de culture VALGÖX

La lignée d'iPSC de lapin B19 est cultivée sur des cellules nourricières (*mouse embryonic fibroblast* ou MEF), en présence de FGF2 et de substitut de sérum Knockout™ (*Knockout™ serum replacement* ou KSR) (milieu KF). Au laboratoire, Marielle Afanassieff et Hong Thu Pham ont mis au point un nouveau milieu de culture appelé VALGÖX constitué d'un milieu N2B27 conditionné sur des cellules nourricières et supplémenté avec la vitamine C, l'activine A, le LIF humain, un inhibiteur de PKC (Gö6983) et un inhibiteur de tankyrases (XAV939). Après 48 heures de culture dans les conditions VALGÖX, les cellules B19 (appelées B19_VAL) forment des colonies plus compactes que lors de leur culture en condition KF

(B19_KF) (Figure 16A). L'analyse par immunofluorescence des cellules B19_VAL, après 48 heures en condition VALGöX, a montré une augmentation du marqueur de pluripotence naïve DPPA5, une augmentation de la marque épigénétique permissive H3K14Ac et une diminution des marques épigénétiques répressives H3K9me3 et 5-méthyl-Cytosine (5mC) par rapport aux cellules B19_KF, suggérant l'initiation d'une transition de la pluripotence amorcée vers la pluripotence naïve (Figure 16A). En analysant le transcriptome des cellules B19_VAL par rapport des cellules B19_KF, j'ai montré une diminution de l'expression de marqueurs de pluripotence amorcée et de gastrulation et une augmentation de l'expression de marqueurs de pluripotence formative (Figure 16B). La capacité des cellules B19_KF et B19_VAL sur-exprimant la protéine fluorescente verte (green fluorescent protein ou GFP) à coloniser l'embryon pré-implantatoire de lapin a ensuite été étudiée. Les cellules B19_KF et B19_VAL présentent une très faible capacité à participer à la formation de l'épiblaste après injection dans un embryon de lapin au stade morula. En effet, 72 heures après injection des cellules B19_KF et B19_VAL, moins de 10% des blastocystes (4,5% pour les cellules B19_KF, 8,6% pour les cellules B19_VAL) obtenus contenaient des cellules GFP+ (Figure 16C). Ces résultats suggèrent que la condition de culture VALGöX favorise la conversion de la pluripotence amorcée vers un état de pluripotence plus immature mais sans permettre une véritable reprogrammation stable à l'état naïf.

Après 14 jours de culture en condition VALGöX (B19_VAL_14d), les cellules ont acquis une morphologie de cellules différenciées (Figure 16D). En analysant leur transcriptome, j'ai constaté une diminution de l'expression de marqueurs de pluripotence naïve, formative et amorcée, ainsi qu'une augmentation de l'expression de marqueurs de lignages, confirmant l'initiation de la différenciation (Figure 16E). La condition de culture VALGöX se révèle donc incapable de maintenir les cellules B19 dans un état indifférencié.

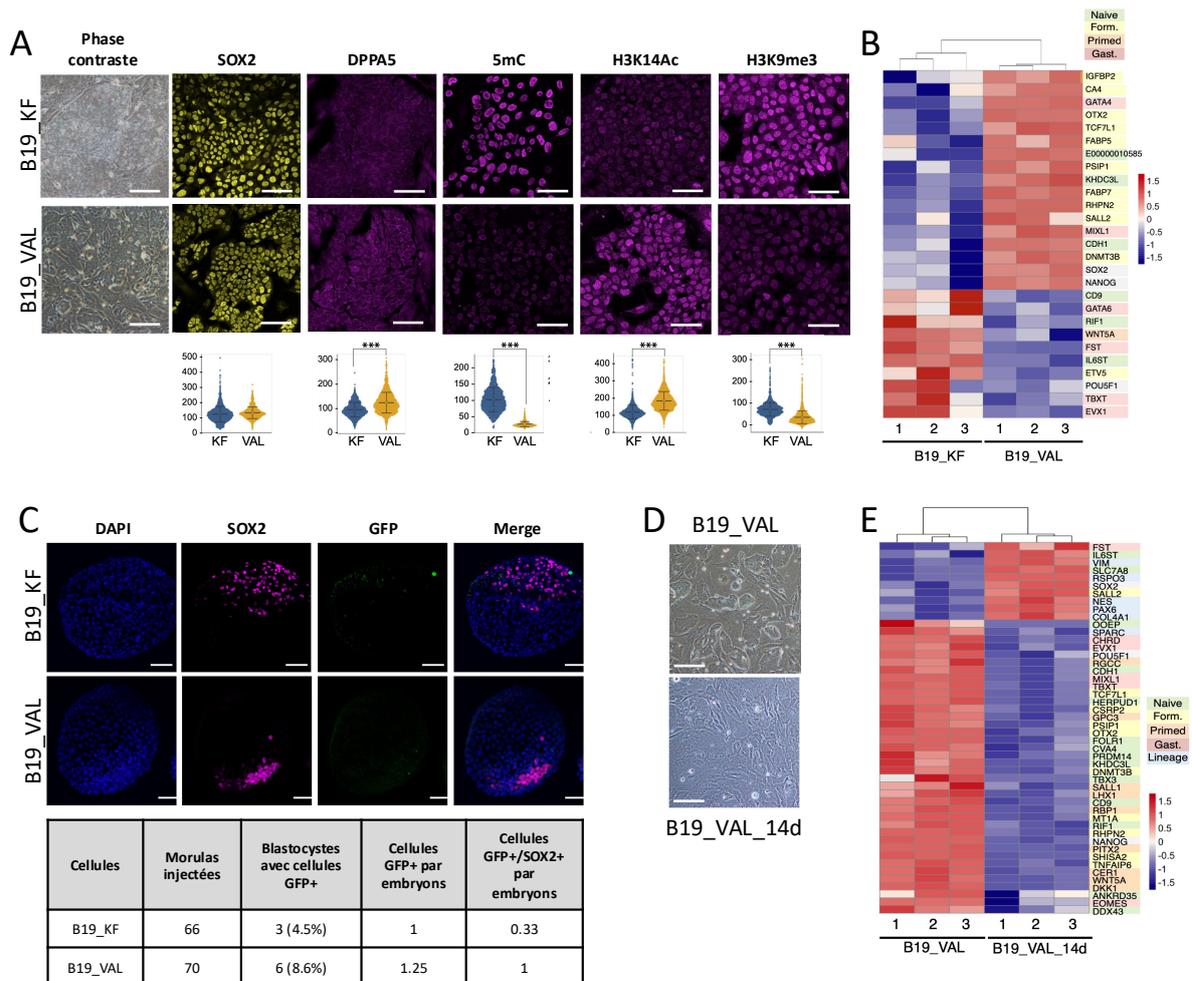


Figure 16 : Le milieu de culture VALGöX initie la conversion des cellules iPSC de lapin vers l'état naïf de pluripotence.

A) Immunomarquages de SOX2, DPPA5, 5mC, H3K14Ac et H3K9me3 dans les cellules B19 avant (_KF) et après (_VAL) conversion en milieu VALGöX. Les *violin plots* représentent la distribution de l'intensité de fluorescence. Un t-test de Welch a été réalisé pour comparer les conditions KF et VAL. La différence est significative (***) lorsque la différence entre deux conditions est supérieure à 10% et la p-value inférieure à $1e-10$. Barres d'échelle : 100 μ m pour la microscopie à contraste de phase et 50 μ m pour la microscopie confocale des immunomarquages. **B)** *Heatmap* représentant les gènes différemment exprimés entre les cellules B19_KF et B19_VAL. Les gènes ont été sélectionnés parmi une liste de 80 gènes différemment exprimés entre l'ICM (E3.5), l'épiblaste précoce (E4.0), l'épiblaste intermédiaire (E5.0) et l'épiblaste tardif (E6.0-6.6) d'embryons de lapin (Bouchereau et al., 2022). **C)** Image de microscopie confocale de blastocystes tardifs obtenues après microinjection des cellules B19_KF ou B19_VAL dans des morulas précoces de lapin et tableau de contingence. Barres d'échelle : 50 μ m. **D)** Image en microscopie à contraste de phase des cellules B19 48h (_VAL) et 14 jours (_VAL_14d) après conversion en milieu VALGöX. Barres d'échelle : 200 μ m. **E)** *Heatmap* représentant les gènes différemment exprimés entre les cellules B19_KF et B19_VAL.

Figure adaptée d'après Perold, Pham, Pijoff *et al.* 2024 (Annexes - Article 1).

1.1.2. Capture d'un état de pluripotence pseudo-naïf grâce au cocktail de gènes *KLF2/ERAS/PRMT6*

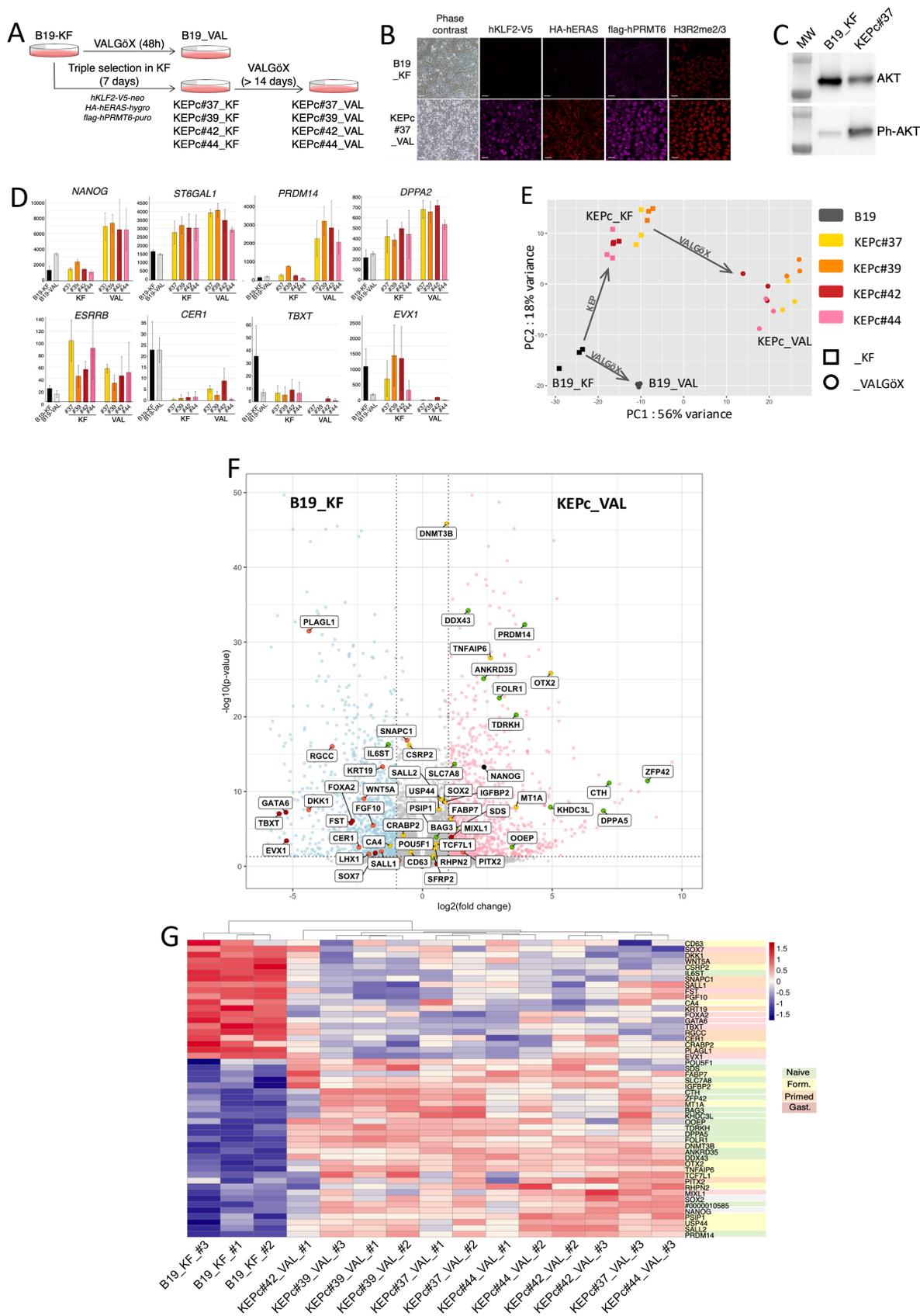
Grâce au criblage d'une banque d'ADNc humains codant des facteurs de la pluripotence naïve humaine et murine, Florence Perold a identifié trois gènes capables, en synergie, de maintenir les cellules iPS de lapin dans un état de pluripotence naïve : *KLF2*, *ERAS* et *PRMT6* (Annexes - Article 1 : Perold, Pham, Pijoff *et al.* 2024). Les cellules B19_KF surexprimant la protéine GFP ont été transfectées avec des plasmides exprimant la protéine humaine *KLF2* associée au tag V5 et une résistance à la néomycine (*hKLF2-V5-neo*), la protéine humaine *ERAS* associée au tag HA et une résistance à l'hygromycine (*HA-hERAS-hygro*) et la protéine humaine *PRMT6* associée au tag FLAG et une résistance à la puromycine (*FLAG-hPRMT6-puro*). Après une triple sélection antibiotique, quatre clones triple-résistants, appelés KEPCconstitutif (KEPc)#37_KF, KEPc#39_KF, KEPc#42_KF, et KEPc#44_KF, ont été isolés et amplifiés (Figures 17A et 17B). Ces clones ont été ensuite cultivés dans le milieu VALGÖX pendant au moins 20 jours. Nous avons ainsi obtenu des lignes cellulaires appelées KEPc#37_VAL, KEPc#39_VAL, KEPc#42_VAL, and KEPc#44_VAL (Figure 17A). Par rapport aux cellules B19_KF, les cellules KEPc_VAL montrent i) une augmentation de la marque épigénétique H3R2me2/3 apposée par l'arginine méthyltransférase *PRMT6* ; ii) une augmentation de l'expression du gène cible de *KLF2*, *ESRRB* et iii) une augmentation de l'activation de *AKT* par phosphorylation, cible de la kinase *ERAS* (Figures 17B, 17C et 17D).

Afin de caractériser l'état de pluripotence des lignées KEPc_VAL, j'ai réalisé une analyse transcriptomique des cellules B19_KF, B19_VAL, KEPc_KF et KEPc_VAL. L'analyse en composantes principales (*Principal component analysis* ou PCA) sépare les lignées de PSC en quatre *clusters* différents. La différence la moins importante est observée entre les cellules B19_KF et B19_VAL avec 597 gènes différentiellement exprimés (*Differentially Expressed Genes* ou DEG) alors que l'on observe la différence la plus importante entre les cellules B19_KF et KEPc_VAL avec 1707 DEG (Figures 17E et 17F). L'expression des marqueurs de pluripotence naïve *ST6GAL1* (codant la protéine CD75), *PRDM14*, et *DPPA2* augmente dans les cellules KEPc_VAL par rapport aux cellules B19_KF et B19_VAL alors que l'expression de marqueurs de pluripotence amorcé *CER1*, *TBXT*, et *EVX1* diminue (Figures 17D et 17F). J'ai également calculé une *heatmap* représentant l'expression, entre les lignées B19_KF et KEPc_VAL, d'une liste de 80 gènes spécifiques de l'ICM (E3.5), l'épiblaste précoce (E4.0), l'épiblaste intermédiaire (E5.0) et l'épiblaste tardif (E6.0-6.6) d'embryons de lapin (Bouchereau *et al.*, 2022) (Figure 17G). Cinquante de ces 80 gènes se trouvent être différentiellement exprimés entre les lignées B19_KF et KEPc_VAL. La plupart des gènes surexprimés par les cellules B19_KF sont majoritairement exprimés dans l'embryon de lapin à E6.0 et E6.6 et sont donc associés à la

pluripotence amorcé et à la gastrulation. En revanche, la grande majorité des gènes surexprimés pas les cellules KEPC_VAL sont prédominant dans l'embryon de lapin à E3.5 et E4.0 et sont donc associé à la pluripotence naïve et formative (Figure 17G). Ces résultats indiquent que l'expression de *KLF2*, *ERAS* et *PRMT6* dans les iPSC cultivées en milieu VALGÖX permet leur conversion de l'état amorcé vers un état pseudo-naïf de pluripotence.

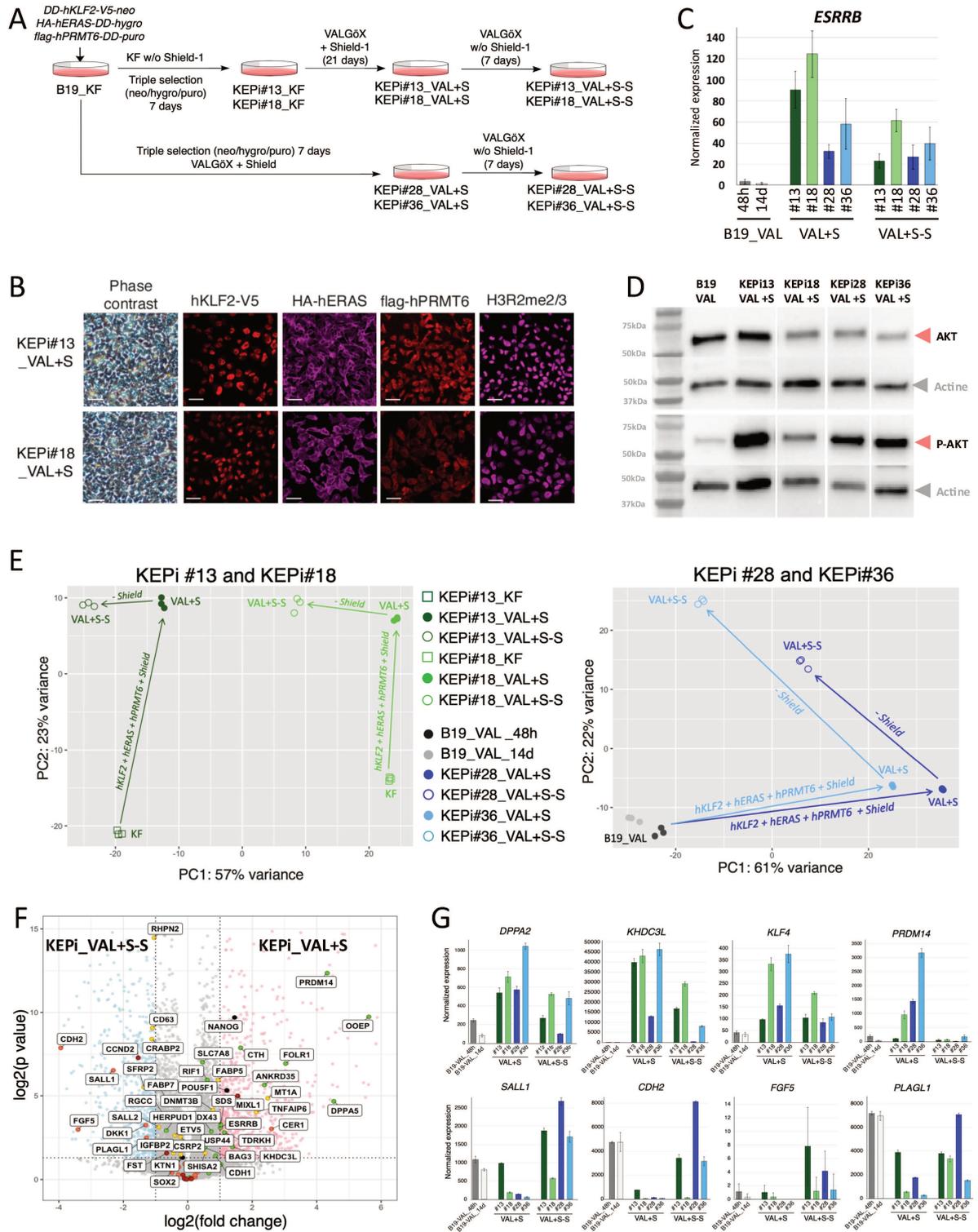
Figure 17 : Les gènes *KLF2/ERAS/PRMT6* associés au milieu VALGÖX permettent la capture d'un état de pluripotence pseudo-naïf.

A) Plan expérimental de la génération des lignées KEPC_KF et KEPC_VAL. **B)** Immunomarquages de KLF2:V5, HA:ERAS, FLAG:PRMT6 et H3R2me2/3 dans les cellules B19_KF et KEPC#37_VAL. Barres d'échelle : 100 µm pour la microscopie à contraste de phase et 50µm pour la microscopie confocale des immunomarquages. **C)** Western blot des protéines AKT et Phospho-AKT (P-AKT) dans les cellules B19_KF et KEPC#37_VAL. **D)** Diagrammes en barre représentant l'expression normalisée de gènes associés à la pluripotence naïve et amorcée dans les populations cellulaires B19_KF, B19_VAL, KEPC_KF et KEPC_VAL basé sur les données transcriptomiques. **E)** PCA à deux dimensions des données transcriptomiques des cinq populations cellulaires (B19 et KEPC) cultivées dans deux conditions différentes (KF et VALGÖX). Des triplicats biologiques ont été réalisé pour chaque condition. **F)** *Volcano plot* représentant les gènes différentiellement exprimés entre les lignées KEPC_VAL et B19_KF. Les points verts correspondent à des gènes associés à la pluripotence naïve, les jaunes à la pluripotence formative, les orange à la pluripotence amorcée, les rouges à la gastrulation et les noires au noyau de pluripotence. **G)** *Heatmap* représentant les gènes différentiellement exprimés entre les cellules B19_KF et KEPC_VAL. Les gènes ont été sélectionnés parmi une liste de 80 gènes spécifiquement exprimés dans l'ICM (E3.5), l'épiblaste précoce (E4.0), l'épiblaste intermédiaire (E5.0) et l'épiblaste tardif (E6.0-6.6) d'embryons de lapin (Bouchereau et al., 2022).
Figure adaptée d'après Perold, Pham, Pijoff *et al.* 2024 (Annexes - Article 1).



(Légende page précédente)

Au laboratoire, Florence Perold a également créé une lignée exprimant le cocktail de gènes *KLF2*, *ERAS* et *PRMT6* de manière conditionnelle et réversible. Dans ce but, les cellules B19-GFP_KF ont été transfectées avec trois plasmides codant les protéines KLF2:V5, HA:ERAS et FLAG:PRMT6 fusionnées à un domaine de déstabilisation permettant leur interaction et leur stabilisation par le Shield1 (Banaszynski et al., 2006). Les cellules B19_KF ont été transfectées en absence de Shield1. Deux clones triple-résistants ont été ainsi isolés appelés KEPI#13_KF et KEPI#18_KF. Ces deux clones ont été transférés et cultivés pendant trois semaines dans le milieu de culture VALGÖX supplémenté avec le Shield1, KEPI#13_VAL+S et KEPI#18_VAL+S (Figure 18A). Dans une autre expérience, des cellules B19_KF ont été transfectées avec les trois vecteurs et cultivées directement dans le milieu VALGÖX supplémenté avec le Shield1. Deux autres clones ont été ainsi isolés appelés KEPI#28_VAL+S et KEPI#36_VAL+S (Figure 18A). Comme pour les cellules KEPC_VAL, les cellules KEPI_VAL+S montrent i) la présence de la marque épigénétique H3R2me2/3 apposée par l'arginine méthyltransférase PRMT6 ; ii) une augmentation de l'expression du gène cible de KLF2, *ESRRB* et iii) une augmentation de l'activation de AKT par phosphorylation, cible de la kinase ERAS (Figures 18B, 18C et 18D). Dans un second temps, les cellules KEPI#13_VAL+S, KEPI#18_VAL+S, KEPI#28_VAL+S et KEPI#36_VAL+S ont été cultivées pendant 7 jours sans Shield1 afin d'inactiver les transgènes, ce qui a conduit aux cellules appelées KEPI#13_VAL+S-S, KEPI#18_VAL+S-S, KEPI#28_VAL+S-S et KEPI#36_VAL+S-S (Figure 18A). Pour ma part, j'ai analysé le transcriptome de toutes les cellules KEPI_KF, KEPI_VAL+S, et KEPI_VAL+S-S et représenté les données sous forme de PCA à deux dimensions (Figure 18E). L'activation des transgènes *KLF2*, *ERAS* et *PRMT6* en condition de culture VALGÖX induit d'importants changements transcriptomiques dans les quatre clones analysés. Les changements transcriptomiques induit pas la privation de Shield1 sont mineurs pour les cellules KEPI#13, modérés pour les cellules KEPI#18 et importants pour les cellules KEPI#28 et KEPI#36. Dans les cellules KEPI_VAL+S-S, l'expression des marqueurs de pluripotence naïve *DPPA2*, *KHDC3L*, *KLF4* et *PRDM14* diminue et l'expression des marqueurs de pluripotence amorcée *SALL1*, *CDH2*, *FGF5* et *PLAGL1* augmente par rapport aux cellules KEPI_VAL+S (Figures 18F et 18G). Ces résultats suggèrent que l'extinction des transgènes *KLF2*, *ERAS* et *PRMT6* dans les cellules KEPI_VAL induit la sortie de la pluripotence pseudo-naïve.



(Légende page suivante)

Figure 18 : Les gènes KLF2/ERAS/PRMT6 associés au milieu VALGöX permettent la capture d'un état de pluripotence pseudo-naïf.

A) Plan expérimental de la génération des lignées cellulaires KEPI_VAL+S et KEPI_VAL+S-S. **B)** Immunomarquages de KLF2:V5, HA:ERAS, FLAG:PRMT6 et H3R2me2/3 dans les cellules KEPI#13_VAL+S et KEPI#18_VAL+S. Barres d'échelle : 100 µm pour la microscopie à contraste de phase et 50µm pour la microscopie confocale des immunomarquages. **C)** Diagramme en barre représentant l'expression normalisée de *ESRRB* dans les populations cellulaires B19_VAL_48h, B19_VAL_14d, KEPI_VAL+S et KEPI_VAL+S-S basé sur les données transcriptomiques. **D)** Western blot des protéines AKT et Phospho-AKT (P-AKT) dans les cellules B19_VAL et KEPI_VAL+S. **E)** PCA à deux dimensions des données transcriptomiques des cinq populations cellulaires B19 et KEPI cultivées dans deux conditions différentes (KF et VALGöX). Des triplicats biologiques ont été réalisé pour chaque condition. **F)** *Volcano plot* représentant les gènes différentiellement exprimés entre les lignées KEPI_VAL+S et KEPI_VAL+S-S. Les points verts correspondent à des gènes associés à la pluripotence naïve, les jaunes à la pluripotence formative, les orange à la pluripotence amorcée, les rouges à la gastrulation et les noires au noyau de pluripotence. **G)** Diagrammes en barre représentant l'expression normalisée de gènes associés à la pluripotence naïve et amorcée dans les populations cellulaires B19_VAL_48h, B19_VAL_14d, KEPI_VAL+S et KEPI_VAL+S-S basé sur les données transcriptomiques.

Figure adaptée d'après Perold, Pham, Pijoff *et al.* 2024 (Annexes - Article 1).

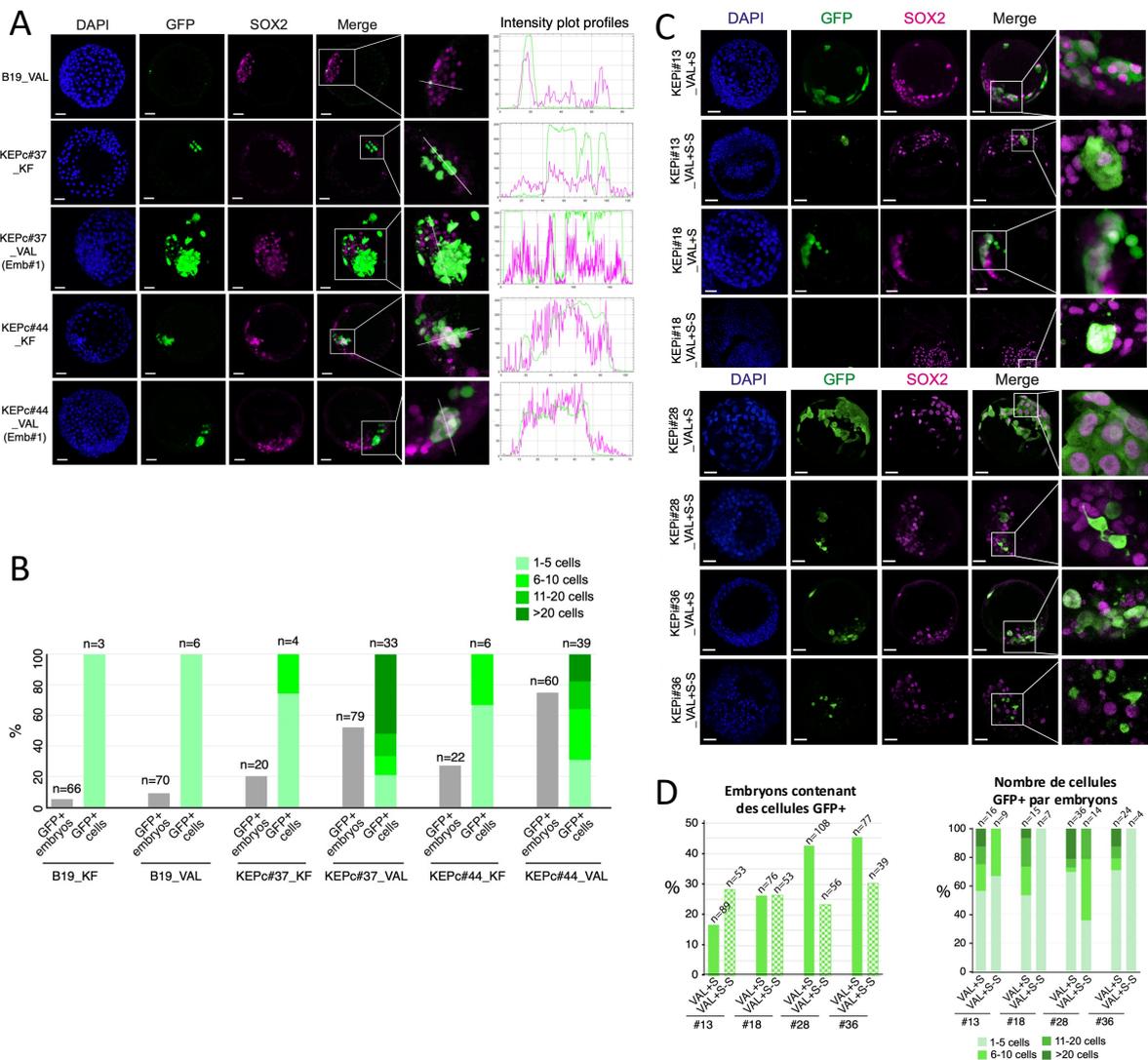
1.1.3. Étude de la colonisation des embryons de lapin par les cellules KEP

Nous avons étudié la capacité des cellules KEPc à coloniser l'embryon de lapin. Dans ce but, huit cellules des lignées KEPc#37_VAL, KEPc#39_VAL, KEPc#42_VAL ou KEPc#44_VAL ont été injectées dans des morula de lapin (E2.5) au cours de trois expériences indépendantes. Les embryons injectés ont ensuite été cultivé trois jours *in vitro* (3 days *in vitro* ou 3DIV) (Figure 19A). L'observation du marqueur GFP exprimé uniquement par les cellules injectées a montré que 63% des blastocystes contenaient des cellules GFP+ après injection des cellules KEPc_VAL, contre 23% après injection des cellules KEPc_KF et 5% après injection des cellules B19_KF (Figure 19B). Le nombre de cellules GFP+ est significativement différents entre les trois conditions d'injections. La majorité des embryons injectés avec les cellules B19_KF et KEPc_KF avait moins de cinq cellules GFP+ après 3DIV. De plus, seulement 7% des embryons injectés avec les cellules KEPc_KF avait plus de cinq cellules GFP+ mais moins de 10 cellules GFP+. A l'inverse, les embryons injectées avec les cellules KEPc_VAL présentaient une forte augmentation de la colonisation. Par exemple, après injection des cellules KEPc#37_VAL, jusqu'à 66% des blastocystes GFP+ contenaient plus de 10 cellules et 50% des blastocystes avaient plus de 20 cellules. La majorité des cellules GFP+ exprimaient SOX2 et étaient localisées au niveau de l'épiblaste (Figures 19A et 19B).

Nous avons ensuite testé la capacité des cellules KEPI_VAL+S et KEPI_VAL+S-S à coloniser l'embryon en injectant huit cellules de chaque lignée dans des morulas de lapin. Après trois jours de culture *in vitro*, 35% des blastocystes analysés (n=350) présentaient des

cellules GFP+ après injection des cellules KEPI_VAL+S contre 25% après injection de cellules KEPI_VAL+S-S (Figure 19C). Après injection de cellules KEPI_VAL+S, le nombre moyen de cellules GFP+ par embryon étaient de 6,5 (de 1 à 27 cellules par embryons) dont la majorité exprimait SOX2 et était localisée dans l'épiblaste. En revanche, après injection de cellules KEPI_VAL+S-S, le nombre de cellules GFP+ diminuaient à 4,9 (de 1 à 10 cellules par embryons) (Figures 19C et 19D).

L'ensemble de ces résultats indique que les transgènes KEP, combinés à la condition de culture VALGöX, augmente significativement la capacité des iPSC à coloniser l'embryon de lapin.



(Légende page suivante)

Figure 19 : Les cellules KEP_VAL, surexprimant *KLF2*, *ERAS* et *PRMT6*, colonisent l'embryon de lapin.

A) Images de microscopie confocale de blastocystes tardifs de lapin (E4.5-5.0, 3DIV) obtenus après microinjection des cellules B19_VAL et KEPc_VAL dans des morulas de lapin (E2.5). Barre d'échelle : 50µm. Sur la partie droite se trouve un profil d'intensité établi à partir d'une ligne unique traversant l'ICM et réalisé à l'aide du logiciel Fiji. Les graphes d'intensité de fluorescence à travers plusieurs canaux (vert pour GFP et magenta pour SOX2) montrent que les cellules GFP+ sont aussi SOX2+. **B)** Diagrammes en barre du pourcentage d'embryons de lapin contenant des cellules GFP+ et de la distribution des embryons en fonction du nombre des cellules GFP+ par embryon. **C)** Images de microscopie confocale de blastocystes tardifs de lapin (E4.5-5.0, 3DIV) obtenus après microinjection des cellules KEPi_VAL+S et KEPi_VAL+S-S dans des morulas de lapin (E2.5). Barres d'échelle : 50µm. **D)** Diagrammes en barre du pourcentage d'embryons contenant des cellules GFP+ et de la distribution des embryons GFP+ en fonction du nombre de cellules GFP+ pour chaque lignée cellulaire micro-injectée.

Figure adaptée d'après Perold, Pham, Pijoff *et al.* 2024 (Annexes - Article 1).

1.1.4. Signature transcriptomique des cellules KEP

J'ai entrepris de comparer le transcriptome des cellules B19_KF, B19_VAL, KEPc_KF et KEPc_VAL afin d'identifier les déterminants moléculaires potentiels de la capacité à coloniser l'embryon. Étant donné que les cellules **KEPc_VAL** ont une capacité de colonisation beaucoup plus élevée que les cellules B19_KF, B19_VAL et KEPc_KF, j'ai identifié les gènes activés et réprimés (*upregulated* et *downregulated*) lors de la synergie entre les transgènes KEP et la condition de culture VALGöX. J'ai exclu de cette analyse les gènes dont l'expression était modifiée uniquement par l'expression des transgènes KEP ou par la condition de culture VALGöX. Pour cela, j'ai choisi de retirer de la liste des 1707 gènes différentiellement exprimés (*Differentially Expressed Genes* ou DEG) entre les B19_KF et les KEPc_VAL, les 597 DEG identifiés entre les B19_KF et les B19_VAL (représentant l'effet VALGöX) et les 738 DEG identifiés entre les B19_KF et les KEPc_KF (représentant l'effet KEP) (Figure 20A). Les DEG associés à l'effet VALGöX représentent 23% de la totalité des DEG identifiés entre les B19_KF et les KEPc_VAL, alors que les DEG associés à l'effet KEP ne représentent que 0,4%. Après leur retrait, il reste 1317 gènes représentant l'effet combiné des transgènes KEP et du milieu VALGöX (effet synergique), avec 783 gènes activés et 534 gènes réprimés (Figure 20B). L'analyse des termes *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) effectuée sur la liste des 783 gènes activés dans les cellules KEPc_VAL—et spécifique de la synergie KEP/VALGöX—révèle un enrichissement pour les termes associés au métabolisme des acides aminés (Figures 20C, 20D et 20E). Ceci résulte de l'activation de l'expression de gènes tel que *SDS* (*Serine Dehydratase*), *CTH* (*Cystathionine γ -lyase*), *GLDC* (*Glycine Decarboxylase*), *PSAT1* (*Phosphoserine Aminotransferase 1*), *AMT* (*Aminomethyltransferase*), *GNMT* (*Glycine N-methyltransferase*), *GSS* (*Glutathione Synthetase*), *SMS* (*Spermine Synthase*), *CNPD1*

(*Carnosine Dipeptidase 1*), *CKMT1B* (*Creatine Kinase Mitochondrial 1B*), *ACYP1* (*Acylphosphatase 1*), *PYCR2* (*Pyrroline-5-carboxylate Reductase 2*), *ALDH7A1* et *ALDH8A1* (α -*Aldehyde Dehydrogenase 7A1* et *8A1*) (Figures 20C et 20E). Ces enzymes régulent l'homéostasie de la sérine, la glycine, la lysine, la cystéine, l'alanine, l'arginine, la méthionine, la proline, le tryptophane et le glutamate. Certaines de ces enzymes sont aussi impliquées dans la production de pyruvate (*SDS*), le métabolisme des folates (*SDS*, *GLDC*, *PSAT1* et *GNMT*) et dans le métabolisme énergétique (*CKMT1B*). Cette analyse révèle également un enrichissement de la voie de signalisation NF- κ B avec l'augmentation de l'expression de *BTK* (*Burton's Tyrosine Kinase*), *EDAR* (*Ectodysplasin A Receptor*), *ZAP70* (*Zeta-chain of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70*), *LTBR* (*Lymphotoxin- β Receptor*) et *CD14* (*coreceptor for lipopolysaccharides*) (Figures 20C, 20D et 20E). Ces facteurs stimulent la dégradation du complexe IKK qui induit l'activation de la voie NF- κ B. L'analyse des termes KEGG réalisée sur la liste des gènes activés dans les cellules KEPC_VAL a également révélé un enrichissement de la voie de signalisation p53 avec l'activation de l'expression des gènes *RRM2B/p53R2* (*Ribonucleotide Reductase Regulatory TP53 Inducible Subunit 2B*), *GADD45G* (*Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 γ*) et *SESN2* (*Sestrin 2*) (Figures 20C, 20D et 20E). *RRM2B/p53R2* et *GADD45G* sont deux effecteurs de la signalisation p53 impliqués dans la réparation et la prévention des dommages à l'ADN. *SESN2* active la dégradation de *MDM2* ce qui induit une activation de l'activité de p53. Globalement, ces résultats suggèrent que les cellules KEPC_VAL sont soumises à des changements importants concernant le métabolisme des acides aminés et des folates mais aussi concernant l'amélioration de la survie cellulaire et de la protection contre les dommages à l'ADN.

J'ai ensuite réalisé une analyse d'enrichissement des termes KEGG à partir de la liste des 534 gènes spécifiquement réprimés dans les cellules KEPC_VAL. Cette analyse a révélé un fort enrichissement des voies de signalisation MAPK, WNT et Hippo, ainsi que des molécules associées au guidage axonal (Figures 20C, 20D et 20E). En ce qui concerne la signalisation MAPK, l'expression de plusieurs effecteurs des voies ERK, JNK et p38 est réprimée, tels que les gènes codant les récepteurs *EGFR*, *PDGFRB* et *TGFBR2*, les gènes codant les molécules de signalisation *ARAF*, *MAPKAPK2* et *MAP3K8*, le gène codant la MAPK phosphatase *DUSP2*, et le gène cible de la voie p38, *ELK4* (Figures 20C, 20D et 20E). Concernant la signalisation WNT, l'expression de plusieurs gènes est réprimée tel que ceux des ligands et modulateurs de la voie canonique WNT (*WNT5B*, *GPC4*), leurs récepteurs (*FZD3/4*) et adaptateurs (*PRICKLE2*, *AXIN2*, *DAAM1*) (Figures 20C, 20D et 20E). De plus, le gène *PPP3CA* (*Calcineurin A*) impliqué dans la voie WNT calcium dépendante est réprimé. Différents effecteurs de la signalisation Hippo sont également réprimés. Parmi eux, on trouve les gènes *WWC1/KIBRA*, *LATS2*, et *PPP2R2B* qui codent des régulateurs en amont de YAP/TAZ (Figures 20C, 20D et 20E). Enfin,

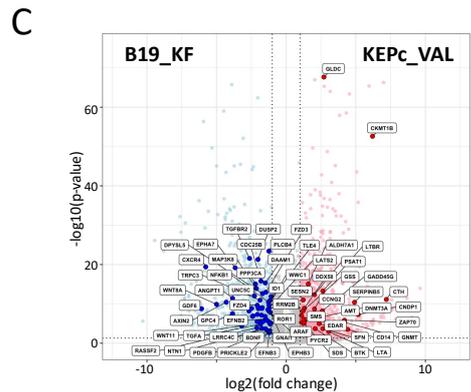
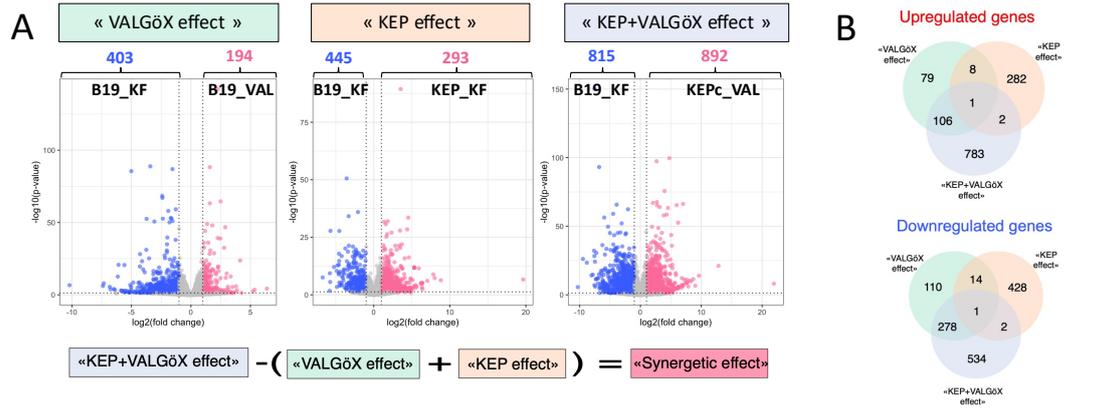
les gènes codant les molécules de guidage axonal sont fortement enrichis dans la liste des gènes réprimés dans les cellules KEPC_VAL. Cela implique la répression de *EFNB2* (*Ephrin B2*), *EPHB1*, *EPHB3*, *EPHB4* (*EPH-related receptors B1/3/4*), *NTN1* (*Netrin 1*) et *PLXNA2* (*Plexin A2*) (Figures 20C, 20D et 20E). Ces résultats indiquent que les cellules KEPC_VAL sont soumises à une atténuation globale de l'activité des voies MAPK, WNT et Nétrine mais aussi de YAP/TAZ et des Ephrines.

J'ai également comparé le transcriptome des cellules **KEPi_VAL+S** par rapport aux B19_VAL et ainsi identifié 339 DEG activés et 460 DEG réprimés. L'analyse des voies de signalisation KEGG sur la liste des DEG activés dans les cellules KEPi_VAL+S a montré un enrichissement des voies moléculaires impliquées dans le métabolisme des acides aminés alors que l'analyse conduite sur les DEG réprimés montrent un lien avec les voies de signalisation MAPK, WNT, Hippo, Nétrine et Ephrines (Figures 20F et 20G). Dans l'ensemble, la signature transcriptomique des cellules KEPi_VAL+S est similaire à celle des cellules KEPC_VAL.

Figure 20 : La signature transcriptomique des iPSC KEP_VAL est associée à une régulation positive du métabolisme des acides aminés et une régulation négative des voies MAPK, WNT, Hippo et du guidage axonal.

A) *Volcano plots* représentant les DEG entre B19_KF et B19_VAL (effet VALGöX), B19_KF et KEPC_KF (effet KEP) et entre B19_KF et KEPC_VAL (effet KEP+VALGöX). **B)** Diagrammes de Venn montrant le nombre de gènes activés et réprimés dans les trois listes de DEG : effet VALGöX, effet KEP et effet KEP+VALGöX. **C)** *Volcano plot* représentant les DEG entre B19_KF et KEPC_VAL. Agrandissement du *volcano plot* présenté en (A). **D)** Analyse de l'enrichissement en termes KEGG basée sur les listes de gènes activés et réprimés spécifiquement dans la synergie KEP/VALGöX. **E)** Diagrammes en barre de l'expression normalisée issue des données de séquençage ARN en *bulk* pour les lignées cellulaires B19_KF, B19_VAL, KEPC_KF et KEPC_VAL. **F)** *Volcano plot* représentant les DEG entre les B19_VAL_48hrs et les KEPi_VAL+S. **G)** Analyse de l'enrichissement en termes KEGG basée sur les listes de gènes activés et réprimés spécifiquement dans les KEPi_VAL+S par rapport aux B19_VAL_48hrs. Les DEG sont définis avec un *fold change* > (2) ou < (-2) et avec une *p-value* < 0,05.

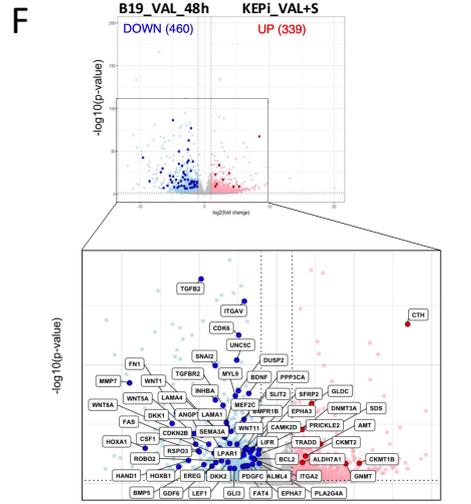
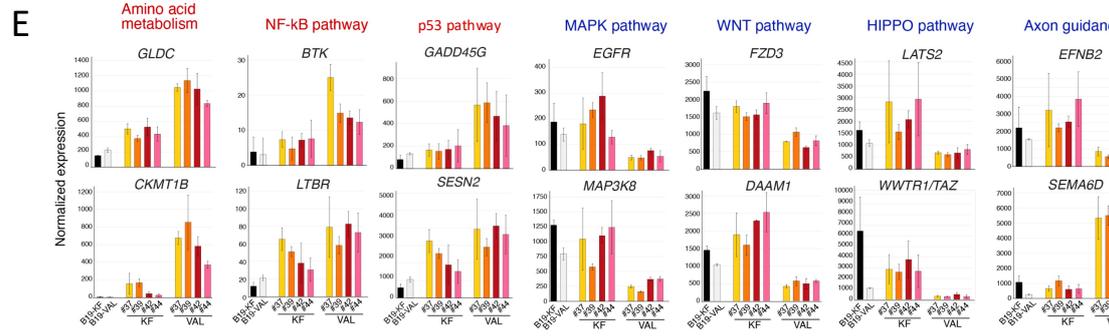
Figure adaptée d'après Perold, Pham, Pijoff *et al.* 2024 (Annexes - Article 1).



D

Upregulated genes in « Synergetic effect »
 Glycine, serine and threonine metabolism (p-value = 8.27E-04)
SDS/GLDC/PSAT1/CTH/AMT/ALDH7A1/GNMT
 Cysteine and methionine metabolism (p-value = 0.013)
SDS/PSAT1/GSS/CTH/DNMT3A/SMS
 Arginine and proline metabolism (p-value = 0.045)
SMS/CKMT1B/PYCR2/ALDH7A1/CNDP1
 NF-kappa B signaling pathway (p-value = 0.051)
EDAR/ZAP70/DDX58/BTK/LTA/CD14/LTBR/GADD45G
 p53 signaling pathway (p-value = 0.066)
RRM2B/CCNG2/SESN2/SFN/SERPINB5/GADD45G

Downregulated genes in « Synergetic effect »
 Axon guidance (p-value = 8.14E-06)
EPHA7/FZD3/WNT5B/TRPC3/CXCR4/UNC5C/SSH3/NTN1/GNAI1/EFNB2/PPP3CA/EFNB3/DPYSL5/PLXNA2/LRRCA4/MYL9/EPHB3
 Hippo signaling pathway (p-value = 3.27E-05)
FZD3/TGFß2/WNT5B/FZD4/WWC1/WNT8A/WNT8B/AXIN2/GDF6/TGFBR2/RASSF2/LATS2/WNT11/PPP2R2B/ID1
 Wnt signaling pathway (p-value = 4.05E-05)
TLE4/FZD3/WNT5B/FZD4/PRICKLE2/WNT8A/WNT8B/AXIN2/SFRP4/PPP3CA/PLCB4/WNT11/DAAM1/ROR1/GPC4
 MAPK signaling pathway (p-value = 4.59E-05)
PDGFRß/DUSP2/TGFß2/ANGPT1/BDNF/ARAF/PDGFR/TGFA/VEGFC/EGFR/NFKB1/CDC25B/TGFBR2/ELK4/PPP3CA/DUSP10/MAPKAP2/MAP3K8/FLNC/CACNG4/FGF10



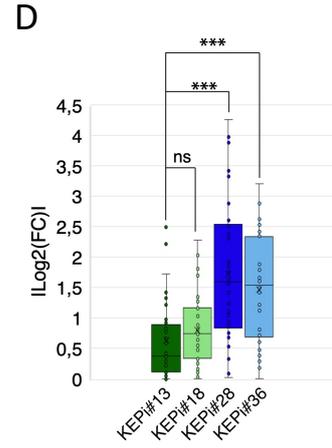
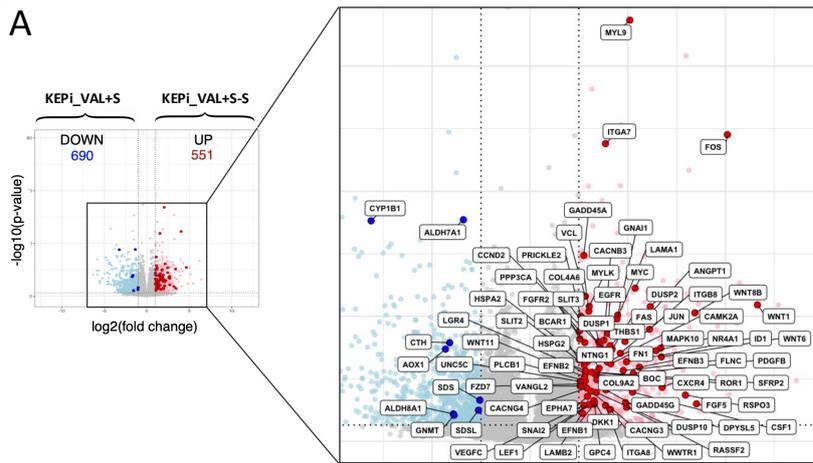
G

Upregulated genes in KEPi_VAL+S
 Glycine, serine and threonine metabolism (p-value = 5.36E-05)
SDS/GLDC/CTH/AMT/ALDH7A1/GNMT
 Cysteine and methionine metabolism (p-value = 0.053)
SDS/CTH/DNMT3A/
 Arginine and proline metabolism (p-value = 0.053)
CMKT2/CKMT1B/ALDH7A1

Downregulated genes in KEPi_VAL+S
 Wnt signaling pathway (p-value = 3.11E-05)
CAMK2D/MMP7/WNT5A/LEF1/PRICKLE2/WNT8A/DKK1/DKK2/PPP3CA/SFRP2/WNT11/RSPO3/WNT1/PLCB1
 Hippo signaling pathway (p-value = 1.05E-04)
TGFß2/WNT5A/LEF1/WNT8A/GDF6/BMP5/TGFBR2/FRM D6/WNT11/SNAI2/FAT4/WNT1/BMPR1B
 Axon guidance (p-value = 3.13E-04)
NTNG1/ROBO2/EPHA7/CAMK2D/SEMA3C/SEMA3A/WNT5A/UNC5C/PPP3CA/SLIT2/BMPR1B/MYL9/EPHA3
 Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells (p-value = 0.002)
WNT11/WNT5A/HAND1/WNT8A/HOXA1/LIFR/HOXB1/INHBA/WNT1/BMPR1B
 Pathways in cancer (p-value = 0.012)
CDKN2B/TGFß2/CAMK2D/LAMA1/ITGA2/LAMA4/WNT5A/LEF1/FN1/WNT8A/LPAR1/CALML4/GLI3/TGFBR2/CDK6/WNT11/BCL2/FAS/ITGAV/PLCB1/WNT1
 MAPK signaling pathway (p-value = 0.019)
MEF2C/DUSP2/TGFß2/CSF1/ANGPT1/BDNF/TRADD/PLA2G4A/EREG/TGFBR2/PPP3CA/PDGFC/FAS

(Légende page précédente)

Enfin, dans le but de caractériser la stabilité des cellules KEPI, j'ai identifié les DEG entre les cellules KEPI_VAL+S et les cellules **KEPI_VAL+S-S** (Figure 21A). Une analyse de l'enrichissement des termes KEGG à partir des 690 gènes réprimés dans les cellules KEPI_VAL+S-S montrent un enrichissement pour le métabolisme de la glycine, la sérine, la thréonine et le tryptophane et implique la répression de gènes tel que *ALDH7A1*, *CKMT1B* et *CTH* (Figures 21B et 21C). A l'inverse, l'analyse des termes KEGG à partir 551 gènes activés dans les cellules KEPI_VAL+S-S montrent un enrichissement pour les voies de signalisation WNT, Hippo et MAPK et impliquent l'augmentation de l'expression de gènes tel que *EGFR*, *MAP3K8*, *PRICKLE2*, *LATS2*, *WWTR1/TAZ*, *FZD7*, *ROR1*, *EPHB2*, et *EPHB3* (Figures 21B et 21C). Par conséquent, les changements transcriptomiques associé à l'extinction des transgènes KEP est l'image en miroir, bien qu'atténuée, des changements transcriptomiques observés lors de la transition des cellules B19_VAL à KEPC_VAL et KEPI_VAL+S. De manière intéressante, les quatre lignées cellulaires KEPI_VAL diffèrent sur un point : le *fold change* moyen entre les conditions +S et +S-S, calculé sur les 42 DEG associés aux voies de signalisation WNT, Hippo, MAPK et au métabolisme des acides aminés, varie significativement entre les lignées. La variation minimale est observée dans les lignées KEPI#13_VAL et KEPI#18_VAL alors que la variation maximale est observée dans les lignées KEPI#28_VAL et KEPI#36_VAL (Figure 21D). Cette différence de stabilité peut être comparée aux résultats de la colonisation, où les lignées KEPI#28_VAL+S-S et KEPI#36_VAL+S-S ont une capacité de colonisation très réduite en comparaison à celle des lignées KEPI#13_VAL+S-S et KEPI#18_VAL+S-S.



B

KEGG Pathways

Downregulated genes in KEPI_VAL+S-S versus KEPI_VAL+S

Glycine, serine and threonine metabolism (p-value = 0.011)

SDS/CTH/SDSL/ALDH7A1/GNMT

Tryptophan metabolism (p-value = 0.055)

AOX1/CYP1B1/ALDH8A1/ALDH7A

Upregulated genes in KEPI_VAL+S-S versus KEPI_VAL+S

Wnt signaling pathway (p-value = 6.40E-09)

JUN/FZD7/CAMK2A/LEF1/PRICKLE2/WNT8B/DKK1/MAPK10/WNT6/PPP3CA/CCND2/SFRP2/VANGL2/WNT11/MYC/RSPO3/ROR1/GPC4/WNT1/PLCB1/LGR4

Focal adhesion (p-value = 7.89 E-07)

JUN/LAMA1/LAMB2/PDGFB/FN1/VEGFC/THBS1/EGFR/MYLK/MAPK10/CCND2/COL4A6/ITGA8/ITGB8/ITGA7/COL9A2/FLNC/MYL9/VCL/BCAR1

Upregulated genes in KEPI_VAL+S-S versus KEPI_VAL+S (follows)

MAPK signaling pathway (p-value = 2.34E-06)

JUN/DUSP2/CSF1/ANGPT1/GADD45A/DUSP1/PDGFB/VEGFC/FOS/HSPA2/EGFR/GADD45G/FGF5/MAPK10/PPP3CA/NR4A1/CACNB3/DUSP10/MYC/FAS/FLNC/CACNG3/FGFR2/CACNG4

ECM-receptor interaction (p-value = 1.53 E-04)

LAMA1/LAMB2/COL4A6/ITGA8/FN1/ITGB8/ITGA7/COL9A2/HSPG2/THBS1

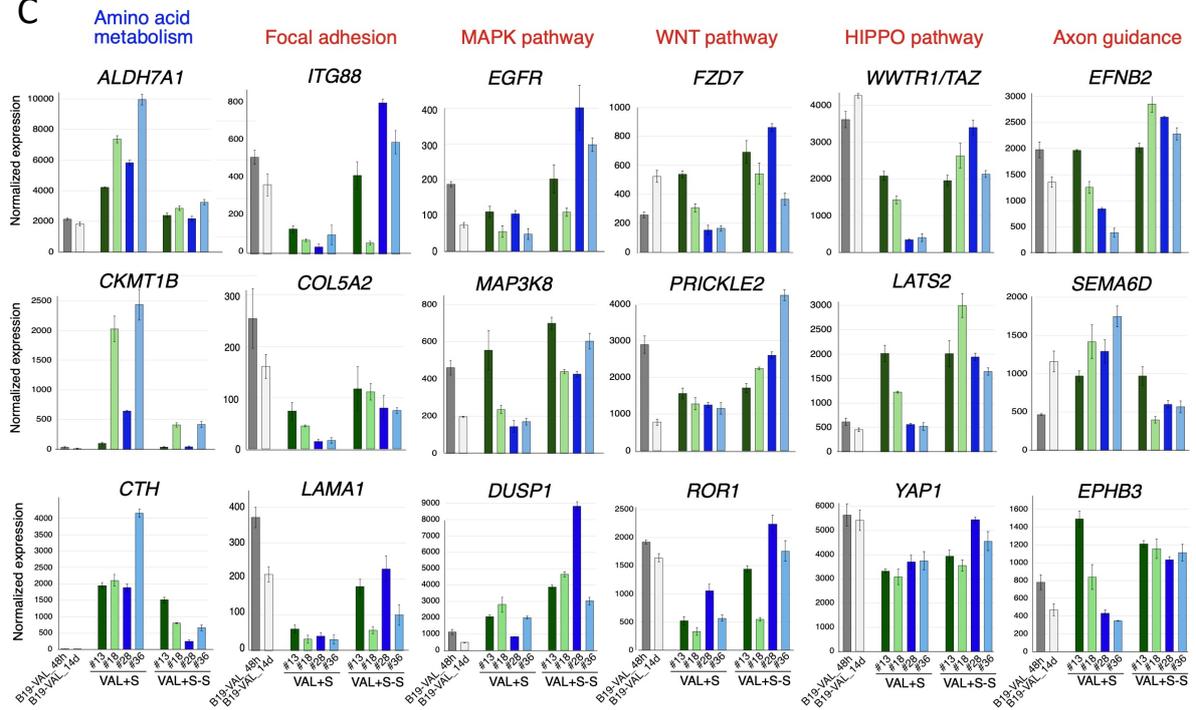
Axon guidance (p-value = 1.63E-04)

NTNG1/EPHA7/CAMK2A/CXCR4/UNC5C/GNA11/EFNB2/EFNB1/PPP3CA/EFNB3/DPYSL5/BOC/SLIT3/SLIT2/MYL9

Hippo signaling pathway (p-value = 0.002)

WNT6/WWTR1/CCND2/RASSF2/WNT11/MYC/FZD7/ID1/LEF1/SNAI2/WNT8B/WNT1

C



(Légende page suivante)

Figure 21 : La signature transcriptomique associée à l’extinction des transgènes KEP est l’image en miroir des changements transcriptomiques observés dans les cellules KEP_VAL.

A) *Volcano plot* représentant les DEG entre KEPi_VAL+S-S et KEPi_VAL+S. **B)** Analyse de l’enrichissement en termes KEGG basée sur les listes de gènes activés et réprimés spécifiquement dans les cellules KEPi_VAL+S-S par rapport aux cellules KEPi_VAL+S. **C)** Diagrammes en barre de l’expression normalisée issue des données de séquençage ARN en *bulk* pour les lignées cellulaires B19_VAL_48hrs, B19_VAL_14d, KEPi_VAL+S et KEPi_VAL+S-S. **D)** Boîtes à moustaches représentant le *fold change* moyen en valeur absolue entre les conditions KEPi_VAL+S et KEPi_VAL+S-S, calculé sur les 42 DEG associés aux voies de signalisation WNT, Hippo, MAPK et au métabolisme des acides aminés (*Mann-Whitney U test* ; *******, *p-value* < 0,001). Les DEG sont définis avec un *fold change* > (2) ou < (-2) et avec une *p-value* < 0,05.

Figure adaptée d’après Perold, Pham, Pijoff *et al.* 2024 (Annexes - Article 1).

1.1.5. Capacité de colonisation embryonnaire des cellules KEPi_VAL exprimant CD75.

Au laboratoire, Hong Thu Pham a révélé l’existence d’une sous-population de cellules KEPc_VAL et KEPi_VAL+S se caractérisant par une expression élevée de la protéine membranaire CD75 (Annexes - Article 1). Cette population représente moins de 10% des cellules. Elle a également montré que ces cellules, dites CD75^{high}, possédaient deux chromosomes X actifs, indiquant qu’elles sont dans un état de pluripotence plus immature que les autres cellules de la population. Nous nous sommes donc intéressés à la capacité des cellules CD75^{high} à coloniser l’embryon de lapin. Des cellules KEPi28_VAL+S exprimant fortement CD75, soit 3-5% des cellules totales (KEPi28_VAL+S CD75^{high}) ont d’abord été triées au FACS (Figure 22A) puis, après 24h de culture, elles ont été injectées dans des morulas de lapin. Trois jours après injection, 100% des blastocystes obtenus présentaient au moins 20 cellules GFP+ (Figure 22B). Ces résultats démontrent que les cellules KEPi28_VAL+S CD75^{high} possèdent une capacité de colonisation des embryons pré-implantatoires fortement augmentée par rapport aux cellules KEPi_VAL+S et KEPc_VAL totales.

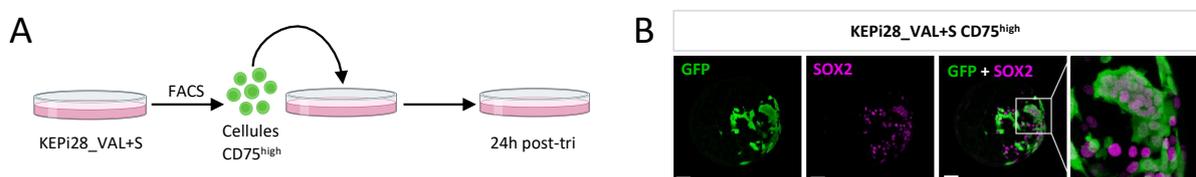


Figure 22 : Les cellules KEPi_VAL+S CD75^{high} colonisent très efficacement l’embryon de lapin.

A) Plan expérimental de l’isolation des cellules KEPi_VAL+S CD75^{high} à partir de la population de cellules KEPi_VAL+S. **B)** Images de microscopie confocale de blastocystes tardifs de lapin (E4.5-5.0, 3DIV) obtenues après microinjection des cellules KEPi_VAL+S CD75^{high} dans des morulas de lapin (E2.5). Barre d’échelle : 50µm.

Figure adaptée d’après Perold, Pham, Pijoff *et al.* 2024 (Annexes - Article 1).

1.1.6. Signature transcriptomique des cellules KEPI_VAL CD75^{high}

Le transcriptome des cellules KEPI28_VAL+S totales et celui des cellules **KEPI28_VAL+S CD75^{high}** a été caractérisé par séquençage ARN. J'ai ensuite recherché les DEG entre les deux catégories de cellules et ainsi identifié 2008 gènes activés et 2896 gènes réprimés dans les cellules KEPI28_VAL+S CD75^{high} par rapport aux cellules KEPI28_VAL+S (Figure 23A). J'ai analysé les termes KEGG à partir de la liste des 2008 gènes activés dans les cellules KEPI28_VAL+S CD75^{high} et montré un enrichissement pour des termes associés aux jonctions et adhésions cellulaires. Ceci résulte de l'augmentation de l'expression de gènes codant des intégrines (*ITGB6*, *ITGB7* et *ITGA3*), la fibronectine (*FN1*), la laminine alpha 3 (*LAMA3*) et le collagène de type 1 alpha 1 (*COL1A1*) (Figure 23B). Ces gènes sont également impliqués dans l'activation de la signalisation PI3K/AKT, ce qui est cohérent avec l'enrichissement de la voie signalisation PI3K/AKT dans les cellules KEPI28_VAL+S CD75^{high} et avec l'activation par phosphorylation de AKT, effecteur de la voie, dans les cellules KEP. De plus, les gènes *ITGA3*, *ITGB6*, *ITGB7* et *FN1* codent des protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine. En effet, on retrouve également un enrichissement pour des gènes encodant des protéines du cytosquelette tel que les tubulines (*TUBA1B*, *TUBA4A*, *TUBB* et *TUBB6*) et l'actinine alpha 1 (*ACTN1*) (Figure 23B). La liste de gènes activés dans les cellules KEPI28_VAL+S CD75^{high} est aussi enrichie en gènes associés à la synthèse d'ARN (« RNA polymérase ») (Figure 23B). Enfin, il est intéressant de noter que les cellules KEPI28_VAL+S CD75^{high} augmentent l'expression du gène anti-apoptotique *BCL2* (Figure 23B). Ces résultats suggèrent que les cellules KEPI28_VAL+S CD75^{high} sont soumises à des changements importants concernant les jonctions cellulaires, les adhésions cellulaires mais aussi concernant les régulations du cytosquelette, l'activation de la synthèse d'ARN et l'amélioration de la survie cellulaire.

En analysant des termes KEGG dans la liste de 2896 gènes réprimés dans les cellules KEPI28_VAL+S CD75^{high}, j'ai montré un enrichissement pour la signalisation MAPK résultant de la diminution de l'expression de gènes associés à la signalisation MAPK non-canonique JNK (*MAPK8IP3*, *MAP3K2*, *MAP3K6*, *MAP4K1*, *MAPK8*, *JUN* et *FOS*) et de la diminution de l'expression de gènes associés à l'activation de la signalisation NF-κB (*MAP3K13*, *MAP3K14* et *NFKB2*) (Figure 23C). L'analyse a également révélé un enrichissement pour les gènes associés aux signalisations des Nétrines, des Ephrines et des Sémaphorines, et un enrichissement pour des gènes associés aux interactions avec la matrice extra-cellulaire (Figure 23C). Ces résultats suggèrent que les cellules KEPI28_VAL+S CD75^{high} sont soumises à une atténuation des voies de signalisation MAPK/JNK, NF-κB, des Nétrines, des Ephrines et des Sémaphorines mais aussi des interactions cellulaires.

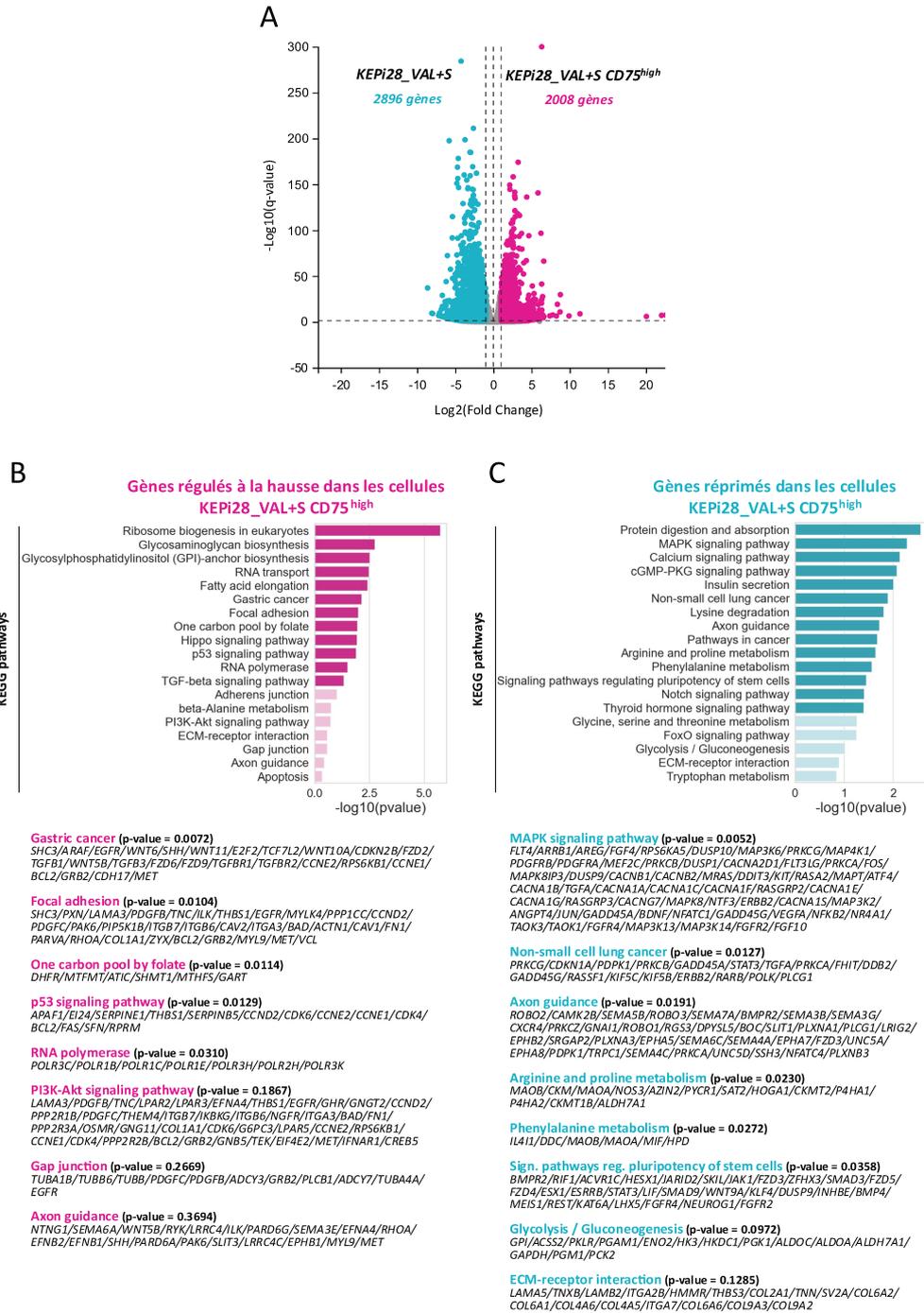


Figure 23 : La signature transcriptomique des iPSC KEPI_VAL+S CD75^{high} est associée à une régulation positive de la survie cellulaire et de la synthèse d'ARN, une régulation négative des voies MAPK/JNK et NF-κB, ainsi qu'une modulation des interactions cellulaires.

A) Volcano plot représentant les DEG entre KEPI28_VAL+S CD75^{high} et KEPI28_VAL+S. **B)** Analyse de l'enrichissement des termes KEGG basée sur les listes de gènes régulés à la hausse dans les cellules KEPI28_VAL+S CD75^{high} par rapport aux cellules KEPI28_VAL+S. **C)** Analyse de l'enrichissement en voies de signalisation KEGG basée sur les listes de gènes réprimés dans les cellules KEPI28_VAL+S CD75^{high} par rapport aux cellules KEPI28_VAL+S. Les DEG sont définis avec un *fold change* > (2) ou < (-2) et avec une *p-value* < 0,05.

1.1.7. Conclusions

Pour conclure, ces résultats nous indiquent qu'une expression réduite des effecteurs des voies de signalisation MAPK/JNK et WNT ainsi qu'une expression élevée de facteurs anti-apoptotiques et de régulateurs des interactions cellulaires sont associées à la capacité élevée des cellules KEPC_VAL et KEPI_VAL+S CD75^{high} à coloniser l'épiblaste hôte (Figure 24). L'activation et l'inhibition de l'expression de différents régulateurs du cytosquelette d'actine tel que les Ephrines, les Nétrines, les Sémaphorines et les protéines du cytosquelette suggèrent des modulations de la structure tridimensionnelle des cellules. De plus, les modulations des jonctions, adhésions et interactions cellulaires dans les cellules KEPI_VAL+S CD75^{high} suggèrent des régulations fines des interactions cellulaires face au microenvironnement cellulaire. Les modulations des interactions cellulaires et de la structure tridimensionnelle peuvent être liées à la plasticité nécessaire aux cellules pour coloniser l'embryon pré-implantatoire.

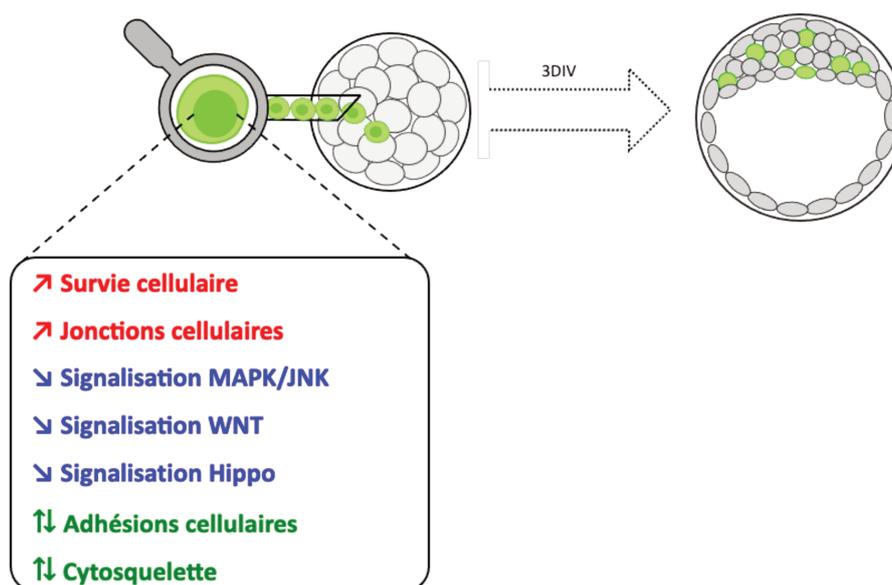


Figure 24 : Caractéristiques transcriptomiques des iPSC de lapin associées à une capacité de colonisation élevée.

Schéma représentant les variations transcriptomiques des cellules capables de coloniser chez le lapin. Les régulations positives sont représentées en rouge, les négatives en bleu et les modulations en vert.

1.2. Chez les primates

Dans un second temps, je me suis intéressée aux caractéristiques spécifiques des PSC de **primates** possédant la capacité de coloniser l'embryon pré-implantatoire. Nous avons reprogrammé des PSC de quatre espèces de primates (chimpanzé, macaque rhésus, marmoset et humain) en utilisant une version modifiée de la méthode VALGÖX : (V)ALGÖX. Nous avons ensuite testé leur capacité de colonisation en injectant chaque lignée dans des embryons de lapin. J'ai ensuite réalisé un séquençage ARN des différentes lignées, avant et après reprogrammation, afin d'identifier leur signature transcriptomique.

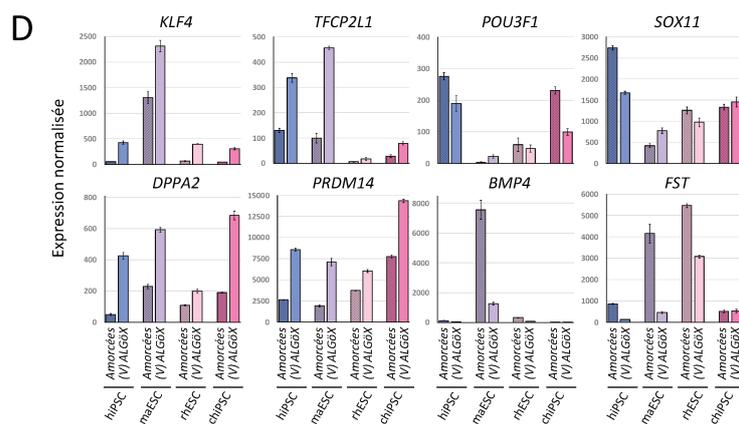
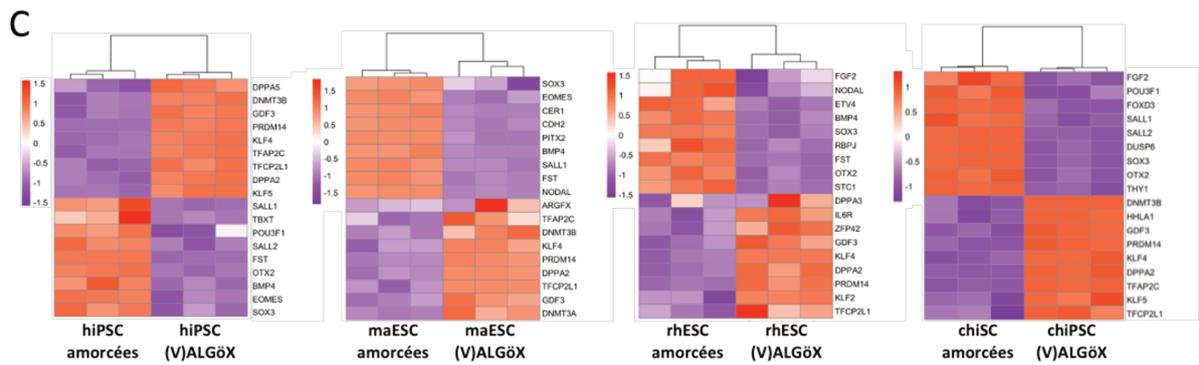
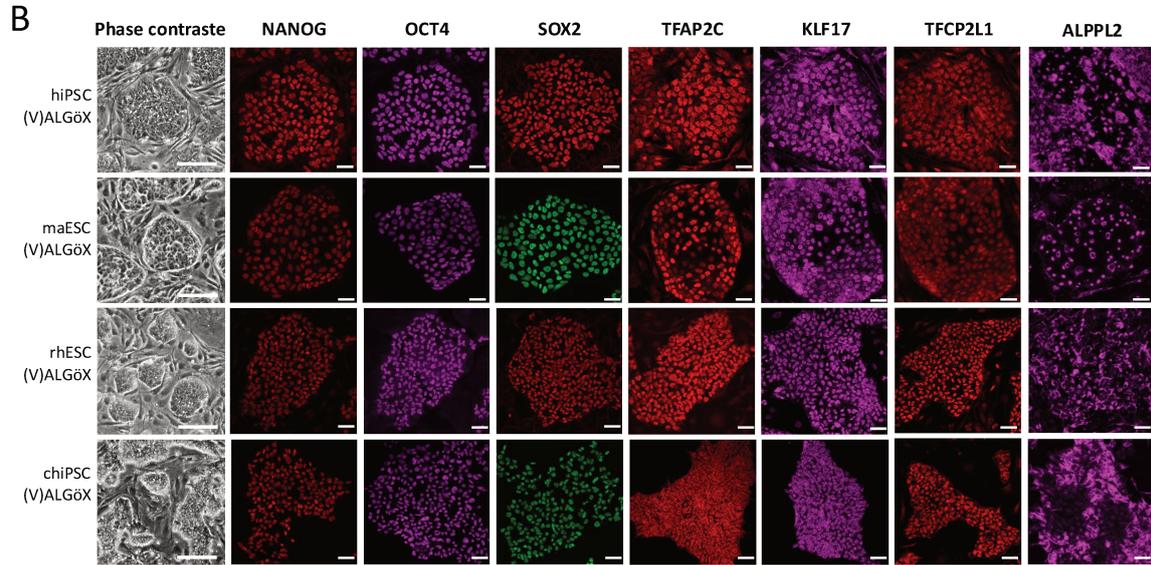
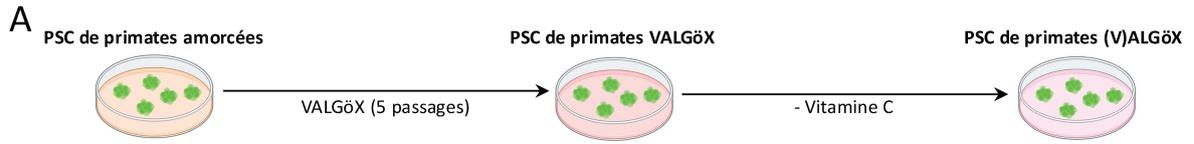
1.2.1. Capture d'un état de pluripotence pseudo-naïf grâce à la méthode de reprogrammation (V)ALGÖX

Au laboratoire, nous possédons quatre lignées de PSC de primates : une lignée d'iPSC humaines HEF36 que nous appellerons hiPSC, une lignée d'iPSC de chimpanzé Sandra que nous appellerons chiPSC (Mora-Bermúdez et al., 2016), une lignée d'ESC de marmoset CMES40 que nous appellerons maESC (Sasaki et al., 2005), et une lignée d'ESC de macaque rhésus LYON-ES que nous appellerons rhESC (Wianny et al., 2008). Les lignées hiPSC et chiPSC sont cultivées dans le milieu commercial mTeSR™1 et les cellules maESC et rhESC sont cultivées en présence de FGF2 et de KSR. Ces quatre lignées de PSC s'auto-renouvellent à l'état amorcée de pluripotence, nous les appellerons « PSC amorcées ». Chaque lignée de PSC de primates a été cultivée dans le milieu VALGÖX en présence de cellules nourricières donnant ainsi les lignées de PSC VALGÖX (Figure 25A). Après cinq passages, la vitamine C a été retirée du milieu de culture et nous avons obtenus les lignées de PSC (V)ALGÖX. Les PSC (V)ALGÖX s'auto-renouvellent et forment de petites colonies compactes en forme de dômes (Figure 25B). L'analyse par immunofluorescence des différentes lignées montre l'expression des facteurs du noyau de pluripotence NANOG, OCT4 et SOX2 mais aussi l'expression des facteurs associés à la pluripotence naïve chez les primates tel que TFAP2C, KLF17, TFCEP2L1 et ALPPL2 (Figure 25B). La comparaison du transcriptome des lignées de PSC de primates cultivées en condition (V)ALGÖX avec les PSC cultivées en condition amorcée montre une augmentation de l'expression de marqueurs de pluripotence naïve tel que *KLF4*, *TFAP2C*, *DPPA2* et *PRDM14* ainsi qu'une diminution d'expression des marqueurs de pluripotence amorcée et de gastrulation tel que *BMP4* et *FST* après la conversion en condition (V)ALGÖX (Figures 25C et 25D). L'expression de marqueurs de pluripotence formative tel que *OTX2* et *SOX3*, est diminuée après reprogrammation (V)ALGÖX (Figure 25C et 25D). En conclusion, ces résultats

suggèrent que les lignées de PSC (V)ALGöX de primates sont converties et stabilisées dans un état de pluripotence pseudo-naïf.

Figure 25 : Les PSC de primates cultivées dans le milieu (V)ALGöX s'auto-renouvellent dans un état de pluripotence pseudo-naïf.

A) Plan expérimental de la génération des lignées de PSC de primates (V)ALGöX à partir des lignées de PSC amorcées. **B)** Immunomarquages de NANOG, OCT4, SOX2, TFAP2C, KLF17, TFCP2L1 et ALPPL2 dans les PSC de primates après conversion en milieu (V)ALGöX. Barre d'échelle : 10µm. **C)** *Heatmap* représentant l'expression de gènes associés à la pluripotence naïve, formative et amorcée entre les lignées de PSC de primates (V)ALGöX et amorcées. **D)** Diagrammes en barre représentant l'expression normalisée de gènes associés à la pluripotence naïve, formative et amorcée dans les lignées cellulaires de PSC de primates (V)ALGöX et amorcées.



(Légende page précédente)

1.2.2. Colonisation des embryons pré-implantatoires par les PSC de chimpanzé cultivées en condition (V)ALGöX

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la capacité de colonisation des PSC de primates (V)ALGöX. Pour cela, nous avons injecté dans des morulas de lapin (E2.5), cinq à huit cellules des lignées hiPSC (V)ALGöX, maESC (V)ALGöX, rhESC (V)ALGöX ou chiPSC (V)ALGöX. Les embryons de lapins ont ensuite été cultivés trois jours *in vitro* (3 days *in vitro* ou 3DIV) (Figure 26A). L'analyse par immunomarquage de l'antigène nucléaire humain (HuN), spécifique des cellules de primates, a révélé que 5,20%, 7,5% et 33,33% des blastocystes contenaient des cellules HuN+ après l'injection des lignées hiPSC (V)ALGöX, rhESC (V)ALGöX et maESC (V)ALGöX, respectivement. De manière intéressante, 96,79% des blastocystes contenaient des cellules HuN+ trois jours après l'injection de la lignée chiPSC-(V)ALGöX (Figures 26B et 26C) avec une valeur médiane de 34 cellules HuN+ par embryon colonisé (Figures 26B et 26D). A l'inverse, on retrouve seulement 2,5 et 4 cellules HuN+ par blastocyste après l'injection des cellules des lignées hiPSC (V)ALGöX et rhESC (V)ALGöX respectivement. Concernant les cellules maESC (V)ALGöX, on retrouve 17 cellules HuN+ par blastocyste trois jours après injection. Après injection des cellules chiPSC (V)ALGöX, la majorité des cellules HuN+ exprimait SOX2 et se trouvaient dans l'épiblaste du blastocyste injecté (Figures 26B et 26E). Par ailleurs, nous avons également injecté les quatre lignées de PSC à l'état amorcée. L'analyse par immunomarquage des embryons injectés a révélé une faible capacité de colonisation de ces cellules (données non présentées).

Ces résultats révèlent que les lignées de PSC de chimpanzé et de marmoset cultivées en condition (V)ALGöX sont capables de coloniser les embryons préimplantatoires de lapin. En revanche, les PSC (V)ALGöX de chimpanzé colonisent plus efficacement les embryons de lapin que les PSC (V)ALGöX de marmoset. Nous avons donc décidé de nous focaliser sur l'analyse des cellules chiPSC (V)ALGöX.

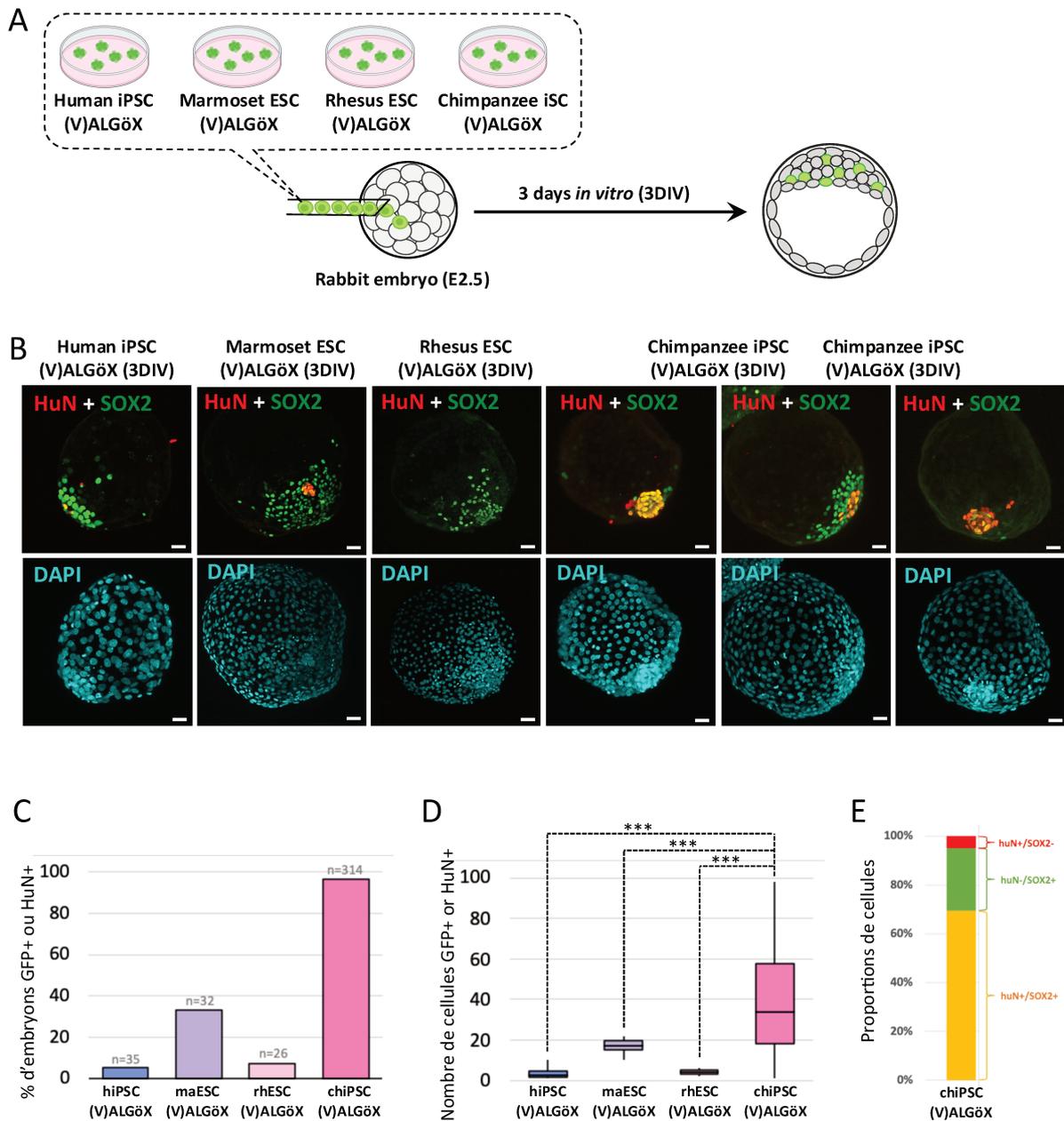


Figure 26 : Les PSC de chimpanzé (V)ALGöX colonisent très efficacement l'embryon de lapin.

A) Plan expérimental de l'obtention des blastocystes tardifs de lapin (E4.5-5.0, 3DIV) obtenus après microinjection des PSC de primates (V)ALGöX dans des morulas de lapin. **B)** Images de microscopie confocale des immunomarquages de SOX2 et HuN réalisés sur des blastocystes tardifs de lapin (E4.5-5.0, 3DIV) obtenus après microinjection des PSC de primates (V)ALGöX dans des morulas de lapin. Barre d'échelles : 50µm. **C)** Diagramme en barres du pourcentage de blastocystes tardifs de lapin contenant des cellules de primates HuN+ à 3DIV. **D)** Boîtes à moustaches représentant la distribution du nombre de cellules de primates HuN+ par blastocystes tardifs de lapin (*Mann-Whitney test*, *** p-value<0,001). **E)** Diagramme en barres du pourcentage de cellules SOX2+/HuN+, SOX2-/HuN- et SOX2-/HuN+ dans les blastocystes tardifs de lapin contenant des cellules chiPSC-(V)ALGöX à 3DIV.

1.2.3. Signature transcriptomique des PSC de chimpanzé

Nous avons caractérisé le transcriptome de la lignée de chiPSC-(V)ALGöX dans le but d'identifier les déterminants moléculaires impliqués dans la capacité de colonisation chez les primates. Pour cela, j'ai d'abord comparé les transcriptomes des lignées (V)ALGöX et des lignées amorcées afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés (*Differentially Expressed Genes* ou DEG) (Figure 27A). J'ai obtenu des listes de 4387 DEG entre les cellules hiPSC (V)ALGöX et amorcées, 1561 DEG entre les cellules rhESC (V)ALGöX et amorcées, 3648 DEG entre les cellules maESC (V)ALGöX et amorcées, et 2765 DEG entre les cellules chiPSC (V)ALGöX et amorcées. Le nombre de DEG varie selon les lignées, suggérant des différences dans la conversion (V)ALGöX propre à chaque espèce.

J'ai ensuite comparé ces listes de gènes entre les quatre espèces afin d'identifier les mécanismes uniques à la conversion (V)ALGöX chez le chimpanzé (Figure 27B). 849 gènes ont été identifiés comme spécifiquement activés dans les cellules chiPSC-(V)ALGöX. Une analyse d'enrichissement des termes KEGG a mis en évidence plusieurs voies enrichies dont :

- la voie PI3K/AKT avec l'expression de gènes tel que *RPTOR*, *GYS1* et *ERBB4* ;
- les interactions avec la matrice extracellulaire avec l'expression de gènes codant pour des intégrines *ITGA9*, *ITGB3* et *ITGB5* ; des laminines *LAMB1*, *LAMB3*, *LAMC2* et *LAMC3* ; des collagènes *COL6A2* et *COL6A6* ; la fibronectine 1 *FN1* ;
- l'adhésion cellulaire ;
- le guidage axonal via la signalisation des Ephrines, Sémaphorines et Nétrines ;
- le métabolisme des acides aminés tel que le tryptophane et l'alanine (Figure 27C).

En parallèle, j'ai réalisé une analyse d'enrichissement des termes KEGG sur la liste des 918 gènes spécifiquement réprimés dans les cellules chiPSC-(V)ALGöX. Cette analyse a révélé un enrichissement pour :

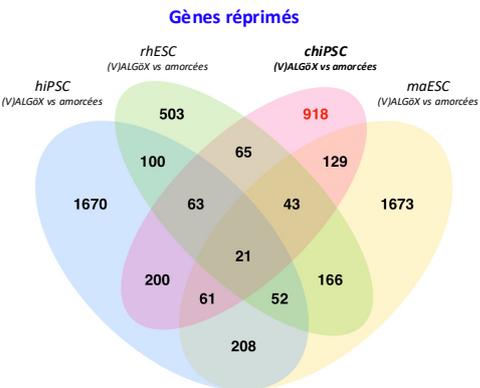
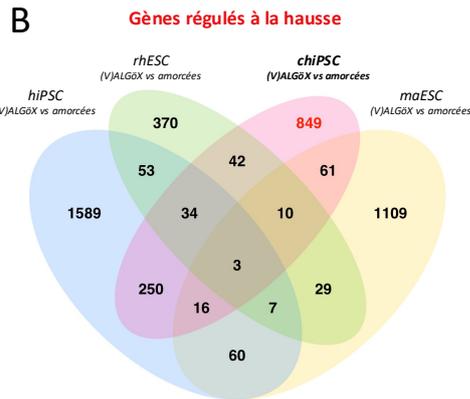
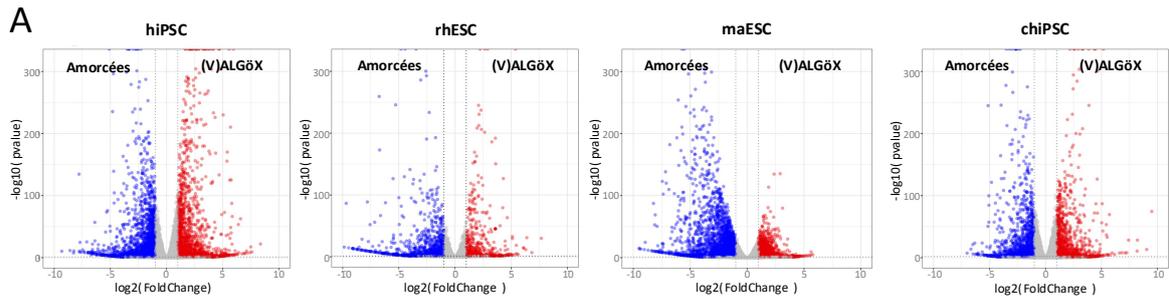
- des gènes impliqués dans la signalisation p53 avec une diminution de l'expression des cyclines D *CCND1* et *CCND2*, ainsi que des facteurs pro-apoptotiques *BAX* et *BCC3* (encodant PUMA) ;
- des gènes associés à la signalisation non-canonique NF- κ B, avec une diminution de l'expression de ligands et récepteurs (*LTA*, *TNFSF14* et *EDA2R*) ainsi que d'effecteurs (*MAP3K14* et *TICAM2*) ;
- le métabolisme des acides aminés tel que la phénylalanine (Figure 27C).

Nous avons porté une attention particulière à la signalisation PI3K/AKT, compte tenu de son implication dans la prolifération et la survie cellulaire. Une analyse par western blot

des niveaux protéiques d'AKT et de sa forme active, Phospho-AKT, a confirmé une augmentation significative de l'expression d'AKT ainsi que de son activation dans les cellules chiPSC-(V)ALGöX par rapport aux trois autres lignées de PSC-(V)ALGöX (Figure 27D). Ces résultats démontrent que les cellules chiPSC-(V)ALGöX activent de manière plus prononcée la voie de signalisation PI3K/AKT par rapport aux autres lignées de PSC-(V)ALGöX, renforçant ainsi leur capacité de prolifération et de survie.

Figure 27 : La signature transcriptomique spécifique de la conversion (V)ALGöX des PSC de chimpanzé est associée à une régulation positive de la voie PI3K/AKT, des interactions cellulaires et du cytosquelette ainsi qu'à une régulation négative de l'apoptose et la signalisation NF- κ B.

A) *Volcano plots* représentant les DEG entre les lignées de PSC (V)ALGöX et amorcées. Les DEG sont définis avec un *fold change* > (2) ou < (-2) et avec une *p-value* < 0,05. **B)** Diagrammes de Venn montrant le nombre de gènes régulés à la hausse et de réprimés dans les quatre listes de DEG identifiés entre les (V)ALGöX et amorcées. **C)** Analyse de l'enrichissement en termes KEGG basée sur les listes de gènes spécifiquement régulés à la hausse et à la baisse dans les cellules chiPSC après leur conversion en milieu (V)ALGöX. **D)** Western blot des protéines AKT et Phospho-AKT (P-AKT) dans les lignées de PSC (V)ALGöX.



C **Gènes spécifiquement régulés à la hausse dans les chiPSC (V)ALGöX vs. amorcées**

ECM-receptor interaction (p-value = 8.36E-05)
ITGB5/VWF/LAMB3/LAMC3/GP1BB/ITGB3/TNC/FN1/LAMC2/LAMB1/COL6A2/COL6A6/ITGA9

PI3K-Akt signaling pathway (p-value = 0.005)
ITGB5/LAMC3/LPAR1/LPAR1/TNC/LAMC2/EFNA4/FGF4/RPTOR/GYS1/FGF8/ERBB4/ANGPT2/VWF/LAMB3/FN1/JGF2/LAMB1/OSMR/FGF17/COL6A2/IL2RB/BCL2/GNB4/COL6A6/ITGA9

Tryptophan metabolism (p-value = 0.008)
ALDH3A2/TDO2/AADAT/KYNU/CYP1A1/CYP1B1

Regulation of actin cytoskeleton (p-value = 0.024)
ITGB5/ITGB3/LPAR1/FN1/CXCR4/IQGAP2/SSH2/FGF4/FGF17/MYLS/ACTR3C/FGF8/SPATA13/ITGAX/ARHGEF6/ITGA9

Focal adhesion (p-value = 0.025)
ITGB5/VWF/LAMB3/LAMC3/ITGB3/FN1/TNC/LAMC2/LAMB1/MYLS/COL6A2/BCL2/COL6A6/BIRC3/ITGA9

Axon guidance (p-value = 0.152)
EPHA4/SEMA6C/MYLS/SEMA7A/TRPC3/CXCR4/UNC5C/SEMA3E/SSH2/EFNA4/NTN1

beta-Alanine metabolism (p-value = 0.133)
ALDH3A2/ACOX1/GAD1

Gènes spécifiquement réprimés dans les chiPSC (V)ALGöX vs. amorcées

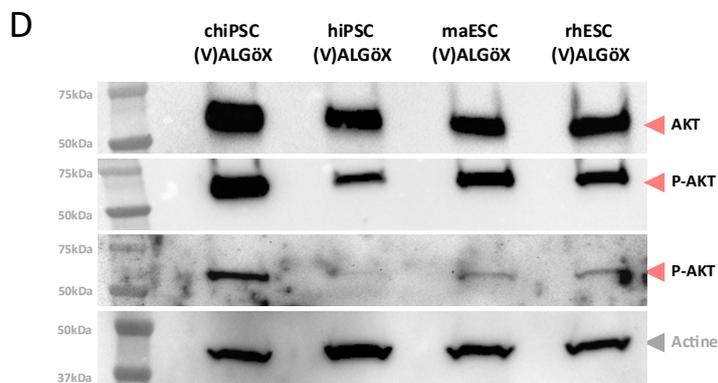
p53 signaling pathway (p-value = 0.006)
CCND2/CD82/CCND1/SEN2/TNFRSF10B/BAX/PPM1D/BBC3/DDB2

Cytokine-cytokine receptor interaction (p-value = 0.010)
IL32/CX3CR1/IL11/CXCL6/CNTF/IL1RN/TNFSF14/TNFRSF18/IL31RA/OSM/TNFRSF10C/IL20RB/IL36G/TNFRSF10B/CSF2RB/EDA2R/CCL4/LTA/IL36RN/TNFRSF14/TNFRSF25/AMH/CCR4

Folate biosynthesis (p-value = 0.029)
ALPP/PAH/GGH/PCBD1

Phenylalanine metabolism (p-value = 0.041)
AOC3/AOC2/PAH

NF-kappa B signaling pathway (p-value = 0.343)
TICAM2/TNFSF14/CCL4/LTA/MAP3K14/EDA2R



(Légende page précédente)

1.2.4. Conclusions

L'analyse transcriptomique des cellules chiPSC-(V)ALGöX révèle des modifications importantes de voies de signalisation et de processus biologiques, tant au niveau des gènes activés que réprimés (Figure 28). D'une part, l'activation des gènes liés à la voie PI3K/AKT, aux interactions avec la matrice extracellulaire et au guidage axonal suggère une augmentation de la prolifération, de la survie cellulaire, ainsi qu'une réorganisation du cytosquelette et des mécanismes d'adhésion cellulaire. Ces processus sont essentiels pour la colonisation et l'intégration des cellules dans leur microenvironnement. D'autre part, la répression des gènes associés à la signalisation p53, à l'apoptose et à la signalisation non-canonique NF-κB reflète une diminution des mécanismes de mort cellulaire programmée et un contrôle plus strict de la progression du cycle cellulaire, permettant ainsi aux cellules de maintenir un état prolifératif tout en limitant les signaux apoptotiques.

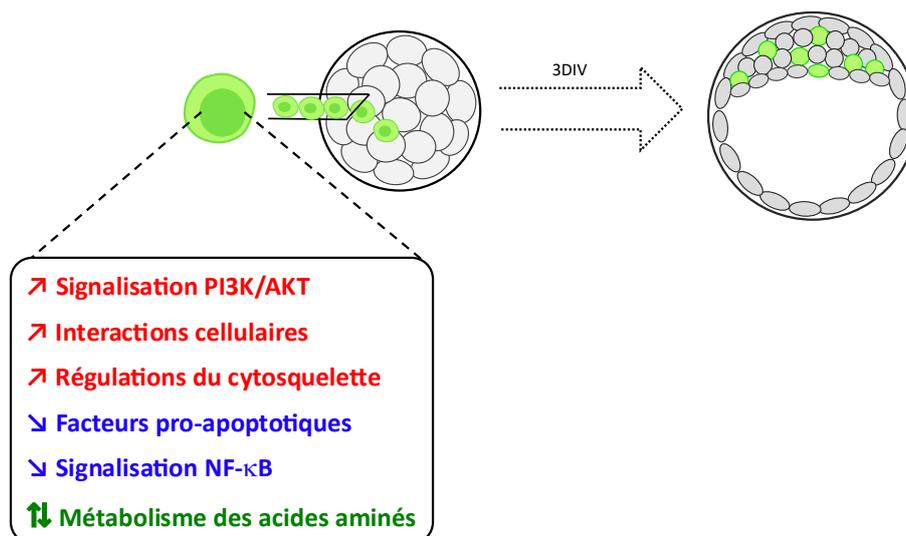


Figure 28 : Caractéristiques transcriptomiques des cellules chiPSC-(V)ALGöX associées à une capacité de colonisation élevée.

Schéma représentant les variations transcriptomiques des cellules capables de coloniser chez le primate. Les régulations positives sont représentées en rouge, les négatives en bleu et les modulations en vert.

1.3. Comparaison inter-espèces des lignées de PSC capables de coloniser l'embryon pré-implantatoire

1.3.1. Étude transcriptomique des lignées des PSC de lapin, de chimpanzé et de souris capables de coloniser

Par la suite j'ai cherché à identifier une signature transcriptomique commune entre les cellules KEPI_VAL+S CD75^{high}, les cellules chiPSC-(V)ALGöX et les cellules mESC, référence pour la capacité de colonisation.

Pour obtenir la signature transcriptomique des cellules mESC, j'ai ré-analysé les données de séquençage ARN de Kinoshita et al. (2021). En comparant le transcriptome des mESC 2iLIF avec celui des cellules EpiSC (*Epiblast Stem Cells*), qui correspondent à l'état amorcé de pluripotence, et qui sont incapables de coloniser l'embryon pré-implantatoire de souris, j'ai identifié 3706 gènes régulés à la hausse et 4615 gènes réprimés dans les cellules mESC 2iLIF.

La comparaison de la signature transcriptomique des cellules mESC 2iLIF avec celle des cellules KEPI_VAL+S CD75^{high} (identifiée dans la partie 1.1.5. de la section Résultats) et des cellules chiPSC (V)ALGöX (identifiée dans la partie 1.2.3. de la section Résultats) a révélé que moins de 5% des gènes sont communs aux trois lignées. Le nombre de gènes n'étant pas suffisant pour une analyse d'enrichissement KEGG, j'ai comparé les signatures deux à deux.

L'analyse des signatures transcriptomiques des cellules **KEPI_VAL+S CD75^{high} et chiPSC-(V)ALGöX** a révélé des similitudes notables dans les gènes régulés à la hausse et à la baisse. En effet, la comparaison des gènes régulés à la hausse a identifié 81 gènes communs, enrichis pour des voies de signalisation clés, notamment la signalisation PI3K/AKT, les adhésions et jonctions cellulaires (incluant *FN1*), ainsi que les voies des éphrines et sémaphorines (telles que *EFNA4* et *SEMA3E*). Le facteur anti-apoptotique BCL2 a également été identifié parmi ces gènes (Figure 29A).

Concernant les gènes réprimés, 142 gènes communs ont été identifiés entre ces deux lignées, enrichis pour des voies biologiques importantes telles que la signalisation MAPK, la signalisation NF-κB non-canonique (impliquant *LTA* et *MAP3K14*), la voie Hippo (avec *LATS2* et *CTNNA2*), et des gènes associés à l'apoptose, comme *BCC3*, qui encode PUMA (Figure 29B).

En élargissant cette analyse aux cellules **chiPSC-(V)ALGöX et mESC 2iLIF**, 110 gènes régulés à la hausse ont été trouvés en commun, enrichis pour des voies similaires, notamment

la signalisation PI3K/AKT et les signalisations des éphrines et sémaphorines (avec *EFNA4*, *EPHA4* et *SEMA6C*), ainsi que des gènes liés à la régulation du cytosquelette d'actine et aux adhésions cellulaires (*FN1* et *LAMC2*) (Figure 29C).

Pour les gènes réprimés, 143 gènes communs ont été identifiés, associés à l'inhibition de la signalisation MAPK/ERK (*DUSP2* et *DUSP6*), la signalisation MAPK/JNK (*MAPK8IP1*), l'activation de la voie Hippo (*LATS2* et *CTNNA2*), et la signalisation NF-κB non-canonique (*LTA* et *MAP3K14*), ainsi qu'au métabolisme des acides aminés (Figure 29D).

Enfin, une comparaison entre les cellules **KEPi_VAL+S CD75^{high}** et **mESC 2iLIF** a mis en évidence 207 gènes régulés à la hausse en commun, enrichis pour la biosynthèse des acides gras insaturés, la signalisation PI3K/AKT, les adhésions cellulaires, la régulation du cytosquelette, et le métabolisme des acides aminés (Figure 29E).

En ce qui concerne les gènes réprimés, 665 gènes communs ont été identifiés, enrichis dans des voies de signalisation MAPK canonique et MAPK/JNK, ainsi que dans les voies des éphrines, sémaphorines, nétrines et SLIT/ROBO, et la voie de signalisation Hippo (Figure 29F).

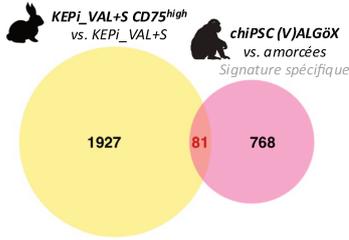
Figure 29 : La signature transcriptomique commune aux cellules KEPi_VAL+S CD75^{high}, chiPSC-(V)ALGöX et mESC 2iLIF est associée à une régulation positive de la voie PI3K/AKT, une régulation négative des voies MAPK/JNK, Hippo et de l'apoptose, ainsi qu'une modulation des interactions cellulaires et des régulations du cytosquelette.

A et B) Diagrammes de Venn des gènes A) régulés à la hausse et B) réprimés dans les chiPSC-(V)ALGöX et KEPi_VAL+S CD75^{high} suivis des analyses d'enrichissement en termes KEGG sur les listes de gènes communs.

C et D) Diagrammes de Venn des gènes C) régulés à la hausse et D) réprimés dans les chiPSC-(V)ALGöX et mESC 2iLIF suivis des analyses d'enrichissement en termes KEGG sur les listes de gènes communs. **E et F)** Diagrammes de Venn des gènes E) régulés à la hausse et F) réprimés dans les KEPi_VAL+S CD75^{high} et mESC 2iLIF suivis des analyses d'enrichissement en termes KEGG sur les listes de gènes communs. Les données transcriptomiques correspondant aux conditions mESC 2iLIF et EpiSC sont issus des travaux de Kinoshita et al. 2021.

A

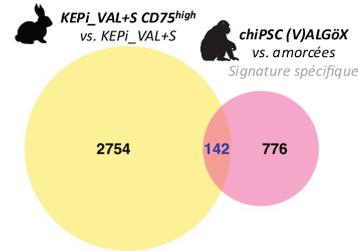
Gènes régulés à la hausse



- KEGG pathways**
- PI3K-Akt signaling pathway** (p-value = 0.0145)
TNCFN1/BCL2/OSMR/EFNA4
 - Focal adhesion** (p-value = 0.0482)
TNCFN1/BCL2
 - ECM-receptor interaction** (p-value = 0.0496)
TNCFN1
 - Axon guidance** (p-value = 0.1682)
SEMA3E/EFNA4

B

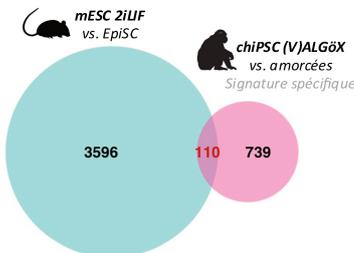
Gènes réprimés



- KEGG pathways**
- MAPK signaling pathway** (p-value = 0.0588)
NR4A1/RASGRP2/MAP3K14/FGFR2/CACNA1G
 - Apoptosis** (p-value = 0.0805)
CTS2/MAP3K14/BBC3
 - Hippo signaling pathway** (p-value = 0.00643496)
LATS2/CTNNA2/BBC3
 - NF-kappa B signaling pathway** (p-value = 0.1687)
LTA/MAP3K14

C

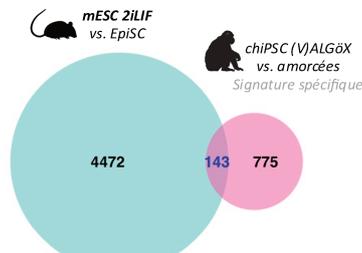
Gènes régulés à la hausse



- KEGG pathways**
- PI3K-Akt signaling pathway** (p-value = 0.0034)
FGF17/VWPF/LPAR1/FN1/LAMC2/EFNA4/FGF4
 - ECM-receptor interaction** (p-value = 0.0127)
VWPF/FN1/LAMC2
 - Rap1 signaling pathway** (p-value = 0.0288)
FGF17/LPAR1/EFNA4/FGF4
 - Regulation of actin cytoskeleton** (p-value = 0.0324)
FGF17/LPAR1/FN1/FGF4
 - Axon guidance** (p-value = 0.0791)
EPHA4/SEMA6C/EFNA4

D

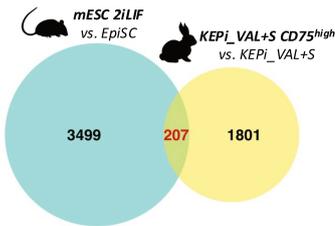
Gènes réprimés



- KEGG pathways**
- MAPK signaling pathway** (p-value = 0.0013)
DUSP2/FGF9/RASGRF1/MAP3K14/FGFR2/DUSP6/MAPK8IP1/CACNA1G
 - Glycine, serine and threonine metabolism** (p-value = 0.0029)
AOC3/AOC2/SARDH
 - Phenylalanine metabolism** (p-value = 0.0064)
AOC3/AOC2
 - Hippo signaling pathway** (p-value = 0.0297)
CCND2/WNT2B/LATS2/CTNNA2
 - Human T-cell leukemia virus 1 infection** (p-value = 0.0724)
CCND2/LTA/MAP3K14/NFATC4

E

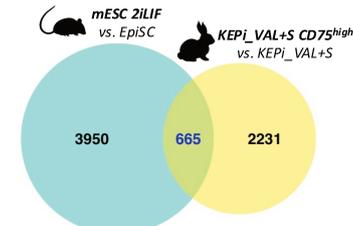
Gènes régulés à la hausse



- KEGG pathways**
- Biosynthesis of unsaturated fatty acids** (p-value = 0.0026)
ACOT7/ELOVL7/HACD2
 - Regulation of actin cytoskeleton** (p-value = 0.0262)
LPAR5/PDGFC/FN1/PIPSK1B/ITGB7/ITGAE
 - beta-Alanine metabolism** (p-value = 0.0384)
SMOX/EHHADH
 - PI3K-Akt signaling pathway** (p-value = 0.0758)
NGFR/LPAR5/PDGFC/FN1/ITGB7/TEK/EFNA4
 - Arginine and proline metabolism** (p-value = 0.0946)
SMOX/CKB
 - Cysteine and methionine metabolism** (p-value = 0.0946)
BHMT2/CDO1
 - Focal adhesion** (p-value = 0.1559)
PDGFC/FN1/PIPSK1B/ITGB7

F

Gènes réprimés



- KEGG pathways**
- MAPK signaling pathway** (p-value = 6.26E-06)
FLT4/CACNA1B/TGFA/ARRB1/CACNA1C/CACNA1G/RASGRP3/CACNG7/DUSP10/INTF3/ERBB2/PDGFRB/PDGFR/MEF2C/JUN/PRKCB/BDNF/CACNA2D1/NFATC1/FOS/DUSP9/GADD45G/VEGFA/CACNB2/MAP3K14/FGFR2
 - Axon guidance** (p-value = 3.84E-05)
EPHA5/ROBO2/ROBO3/EPHA7/FZD3/BMPR2/UNC5A/EPHA8/TRPC1/SEMA4C/SEMA3G/CXCR4/SSH3/NFATC4/DPYSL5/BOC/SLIT1/EPHB2
 - PI3K-Akt signaling pathway** (p-value = 3.56E-04)
FLT4/ITGA2B/TGFA/PIK3R5/THBS3/GNG3/MYB/NF3/ERBB2/PDGFRB/PDGFR/BDNF/NOS3/EPOR/VEGFA/COL2A1/LPAR6/COL6A2/DDIT4/COL6A1/COL4A6/MTC1/COL4A5/ITGA7/FGFR2
 - Tight junction** (p-value = 0.0043)
JUN/GATA4/CGN/AMOT/CLDN10/DLG2/CLDN7/ERBB2/MYH9/MPDZ/MYH10/CGNL1/TUBA8
 - Hippo signaling pathway** (p-value = 0.0724)
FZD3/DLG2/BMPR2/LATS2/DLG4/RASSF6/LEF1/WNT9A/CTNNA2/AMOT/TEAD3

(Légende page précédente)

1.3.2. Conclusions

Pour conclure, tous ces résultats montrent que les cellules KEPI_VAL+S CD75^{high}, chiPSC-(V)ALGÖX et mESC 2iLIF possèdent des mécanismes biologiques partagés, soulignant l'importance des voies de signalisation PI3K/AKT, des adhésions cellulaires et des régulations apoptotiques dans le contexte de la colonisation et des caractéristiques fonctionnelles des cellules (Figure 30).

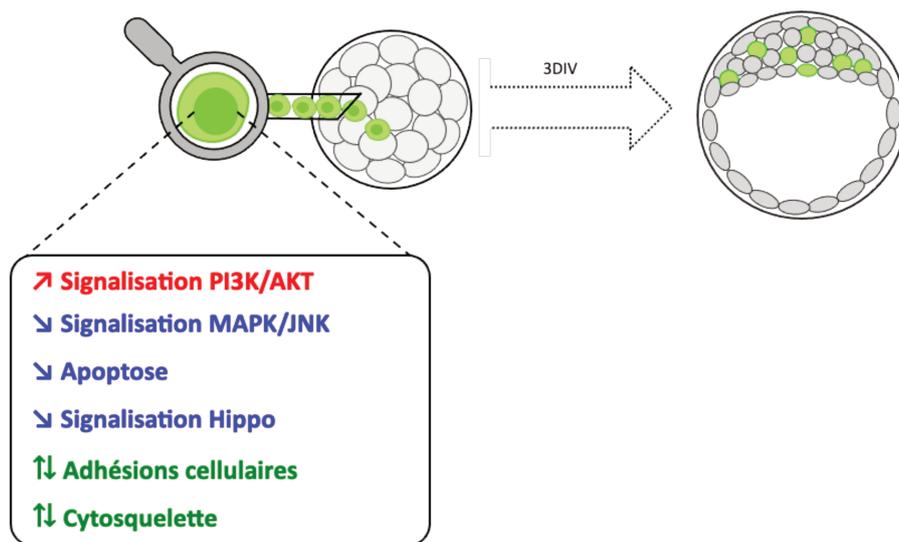


Figure 30 : Caractéristiques transcriptomiques communes aux cellules KEPI_VAL+S CD75^{high}, chiPSC-(V)ALGÖX et mESC 2iLIF, associées à une capacité de colonisation élevée.

Schéma représentant les variations transcriptomiques des cellules capables de coloniser chez le primate, le lapin et la souris. Les régulations positives sont représentées en rouge, les négatives en bleu et les modulations en vert.

2. Étude des changements transcriptomiques survenant lors de la colonisation de l'embryon de lapin par les PSC

Dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressée aux **déterminants moléculaires précoces impliqués lors de la colonisation** de l'embryon de lapin par des PSC de primates et de souris. Pour cela, nous avons injecté dans des morulas de lapin i) les chiPSC (V)ALGöX ou ii) les ESC de souris E14tg2a cultivées en condition LIF/FCS (appelées ici mESC). 48h après injection nous avons séquencé les blastocystes colonisés par les PSC pour étudier le transcriptome des cellules injectées ainsi que celui des embryons hôtes.

2.1. Séquençage ARN sur cellule unique de blastocystes de lapin chimériques

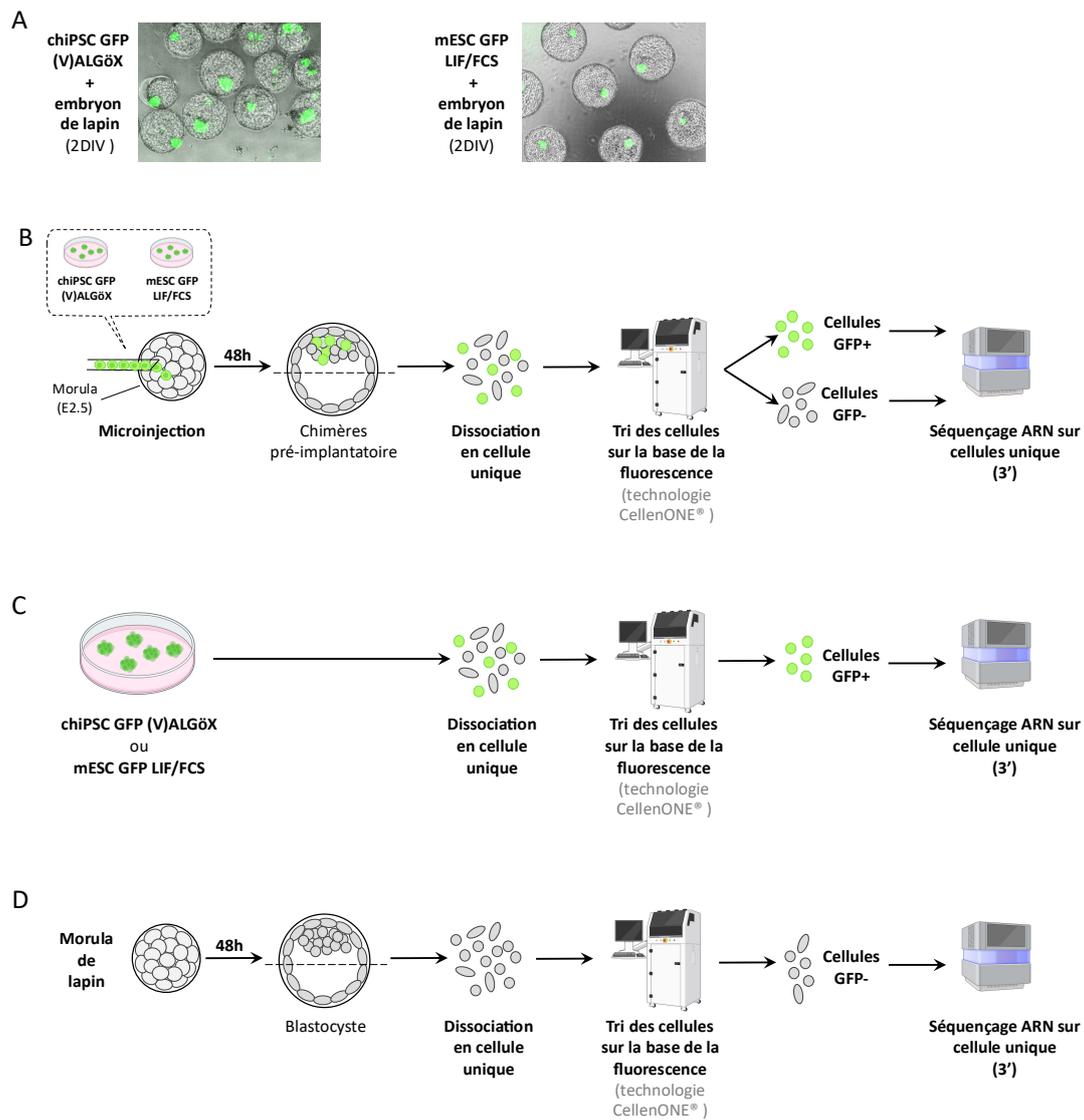
Nous avons injecté cinq à huit cellules chiPSC ou mESC surexprimant la GFP dans des morulas de lapin à E2.5. Les embryons de lapin n'expriment pas la GFP. Après 48h de culture *in vitro* (2DIV) plus de 90% des blastocystes obtenus étaient colonisés par les cellules chiPSC et mESC (Figure 31A). La colonisation était majoritairement localisée dans l'épiblaste.

Pour les étapes suivantes, nous avons sélectionné uniquement les embryons GFP+. De ce fait, nous avons disséqué ces blastocystes chimériques afin de retirer le trophoctoderme mural tout en conservant l'épiblaste, l'endoderme primitif et le trophoctoderme polaire (Figure 31B). Ensuite, nous avons réalisé une dissociation enzymatique des blastocystes disséqués suivi d'un tri basé sur la fluorescence, en utilisant la technologie *CellenONE*®. Nous avons ainsi isolé les cellules GFP+, dérivant des PSC injectées, et les cellules GFP-, dérivant des cellules de l'embryon injecté (Figure 31B).

La technologie *CellenONE*® permet d'isoler des cellules uniques à partir d'un échantillon de faible volume (à partir de 1µL) et contenant un nombre limité de cellules sur une puce de séquençage ARN *CellenCHIP*®. De plus, chaque cellule isolée est photographiée à la fois dans un canal de lumière blanche et dans un canal détectant la GFP, ce qui permet un contrôle qualité optimal des cellules isolées.

Nous avons ensuite séquencé les ARN de quatre groupes de cellules : i) 177 cellules GFP+ correspondant aux cellules chiPSC, ii) 236 cellules GFP- correspondant aux cellules d'embryons injectés avec les cellules chiPSC, iii) 106 cellules GFP+ correspondant aux cellules mESC, et iv) 36 cellules GFP- correspondant aux cellules d'embryons injectés avec les cellules mESC (Figure 31E). En parallèle, nous avons trié et séquencé les ARN de 274 cellules chiPSC et

de 89 cellules mESC cultivées *in vitro* et non injectées, afin de comparer leurs transcriptomes avec celui des cellules 48h après injection (Figures 31C et 31E). De plus, nous avons cultivé des morulas de lapin non injectées durant 48h, puis nous les avons disséquées, dissociées et triées pour effectuer le séquençage ARN de 70 cellules uniques (Figures 31D et 31E). Ces données visent à établir une comparaison entre le transcriptome des embryons de lapin non injectés et celui des embryons injectés.



E

Conditions	chiPSC GFP (V)ALGöX		mESC GFP LIF/FCS		Embryons de lapin		
	Avant injection	Après injection	Avant injection	Après injection	Injectés avec les chiPSC	Injectés avec les mESC	Non injectés
Nombre de cellules séquencées	274	177	89	106	236	36	70

(Légende page suivante)

Figure 31 : Séquençage ARN sur cellule unique d'embryon chimère grâce à la technologie *CellenONE*.

A) Images superposées de microscopie à contraste de phase et du filtre GFP des blastocystes chimères obtenus 48h (2DIV) après l'injection de cellules chiPSC GFP (V)ALGöX ou mESC GFP LIF/FCS dans des morulas de lapin (E2.5). **B)** Plan expérimental de l'obtention et la préparation des cellules d'embryons chimères pour leur séquençage ARN sur cellule unique. **C)** Plan expérimental de l'obtention et la préparation des cellules chiPSC GFP (V)ALGöX ou mESC GFP LIF/FCS, non injectées, pour leur séquençage ARN sur cellule unique. **D)** Plan expérimental de l'obtention et la préparation des cellules d'embryons de lapin non injectés pour leur séquençage ARN sur cellule unique. **E)** Tableau récapitulatif du nombre de cellules séquencées par condition.

2.2. Étude des changements transcriptomiques des PSC durant la colonisation de l'embryon de lapin

Dans un premier temps, je me suis intéressée aux modifications transcriptomiques survenant dans les cellules chiPSC, après leur injection dans les embryons de lapin. Pour cela, j'ai utilisé les données de séquençage ARN en cellule unique, provenant de deux expériences indépendantes, comprenant les cellules chiPSC avant injection et les cellules chiPSC 48h après injection. J'ai nettoyé les deux jeux de données séparément pour retirer les cellules de mauvaise qualité et les cellules multiples (Figure 32A). Pour vérifier l'absence de cellules multiples j'ai utilisé les images prises par la technologie *CellenONE*[®] lors du tri des cellules (Figure 32B).

Concernant la qualité des cellules, les critères d'exclusion comprenaient un faible nombre de gènes uniques détectés (*nFeature*), un faible nombre d'ARN capturés par cellule (*nCount*), ainsi qu'un pourcentage élevé d'ARN mitochondrial (*percent.mt*) (Figure 32C). Après nettoyage et intégration des données, le jeu de données obtenu comprenait 380 cellules, réparties entre 238 cellules chiPSC avant injection et 142 cellules chiPSC après injection. Le nombre moyen de gènes uniques détectés par cellule s'élève à 5300, avec un nombre moyen d'ARN capturés par cellule de 17 800 (Figure 32D).

J'ai ensuite réalisé un partitionnement des données (*clustering*) qui a révélé deux *clusters* de cellules distincts visualisés sur la représentation des deux premières dimensions de UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) (Figure 32E). L'analyse a confirmé que ces deux *clusters* ne correspondent pas aux deux expériences indépendantes réalisées, validant ainsi l'intégration correcte des deux jeux de données (Figure 32F). En revanche, l'identité des deux *clusters* est définie par l'origine des cellules : le premier *cluster* (*cluster 0*) correspond aux cellules chiPSC avant injection et le second (*cluster 1*) correspond aux cellules chiPSC 48h après injection (Figure 32G), indiquant ainsi un changement global du transcriptome des cellules chiPSC après injection dans l'embryon de lapin.

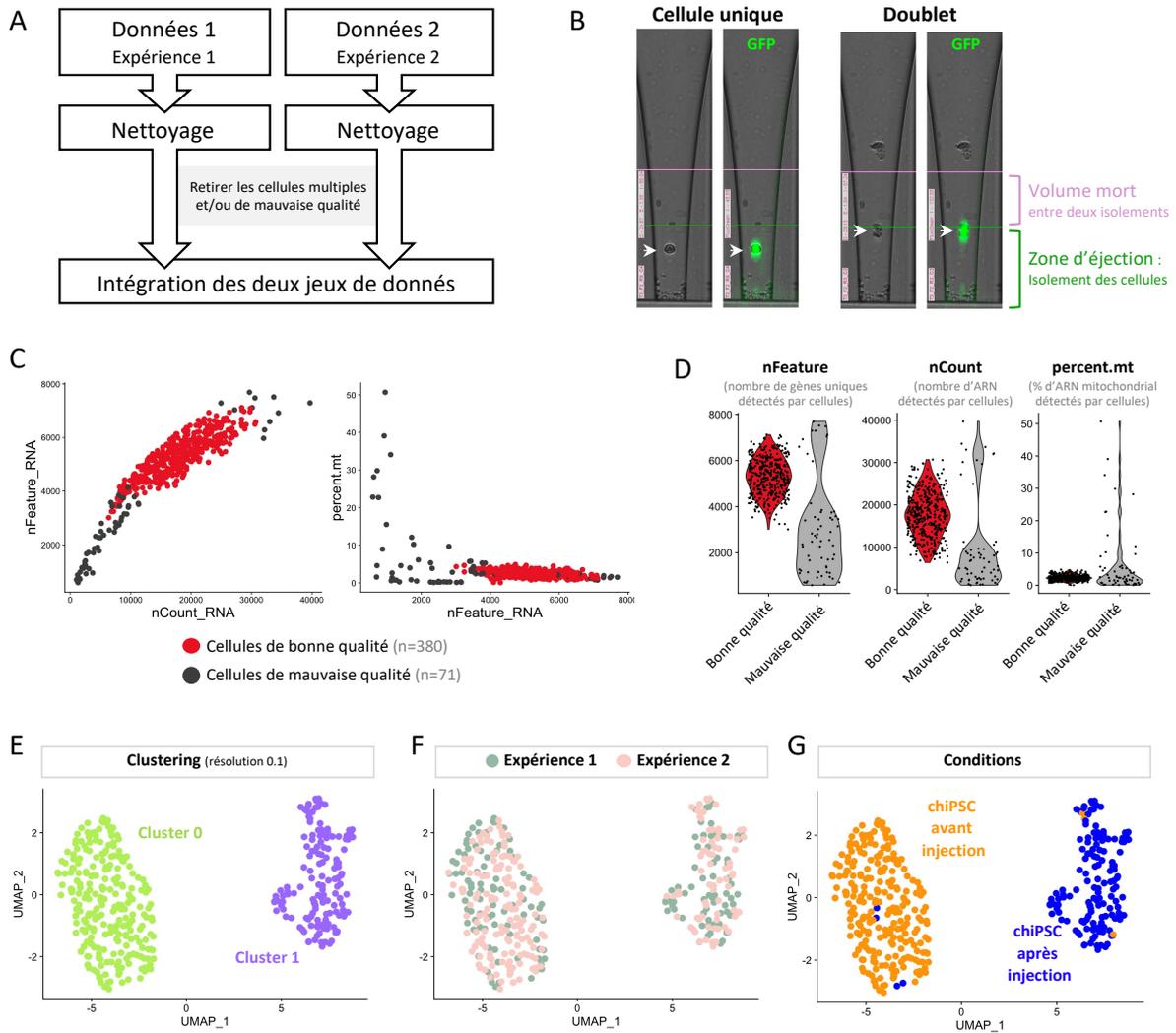


Figure 32 : Pre-processing des données de séquençage ARN sur cellule unique de la lignée cellulaire chiPSC (V)ALGÖX avant et après injection.

A) Schéma explicatif de la préparation du jeu de données. **B)** Images de cellule unique et de doublets, capturées par la technologie *CellenONE®*, en lumière blanche et dans le canal détectant la GFP. **C)** Scatter plot représentant chaque cellule du jeu de données en fonction du nombre de gènes uniques détectés (nFeature_RNA) et du nombre d'ARN capturés (nCount_RNA) ou du pourcentage d'ARN mitochondrial détecté (percent.mt) et du nombre de gènes uniques détectés (nFeature_RNA). **D)** Violin plots représentant le nombre de gènes uniques détectés (nFeature), le nombre d'ARN capturés (nCount) et le pourcentage d'ARN mitochondrial détecté (percent.mt) en fonction de la qualité des cellules du jeu de données. **E, F et G)** Feature plot des deux premières dimensions de UMAP en fonction E) des clusters identifiés lors du partitionnement des données (*clustering*), F) des expériences réalisées et G) de la condition expérimentale (avant ou après injection).

De la même manière que pour les données relatives aux cellules chiPSC, j'ai nettoyé et partitionné les données de séquençage ARN sur cellules uniques provenant des cellules mESC avant injection et après injection dans l'embryon de lapin. J'ai ainsi obtenu 161 cellules de bonne qualité (86 cellules mESC avant injection et 75 cellules mESC après injection) (Figures 33A et 33B). Comme pour les cellules chiPSC, les deux *clusters* obtenus correspondent aux populations cellulaires mESC avant et après injection (Figures 33C et 33D). Cela suggère également que le transcriptome global des cellules mESC est modifié après leur injection dans l'embryon de lapin.

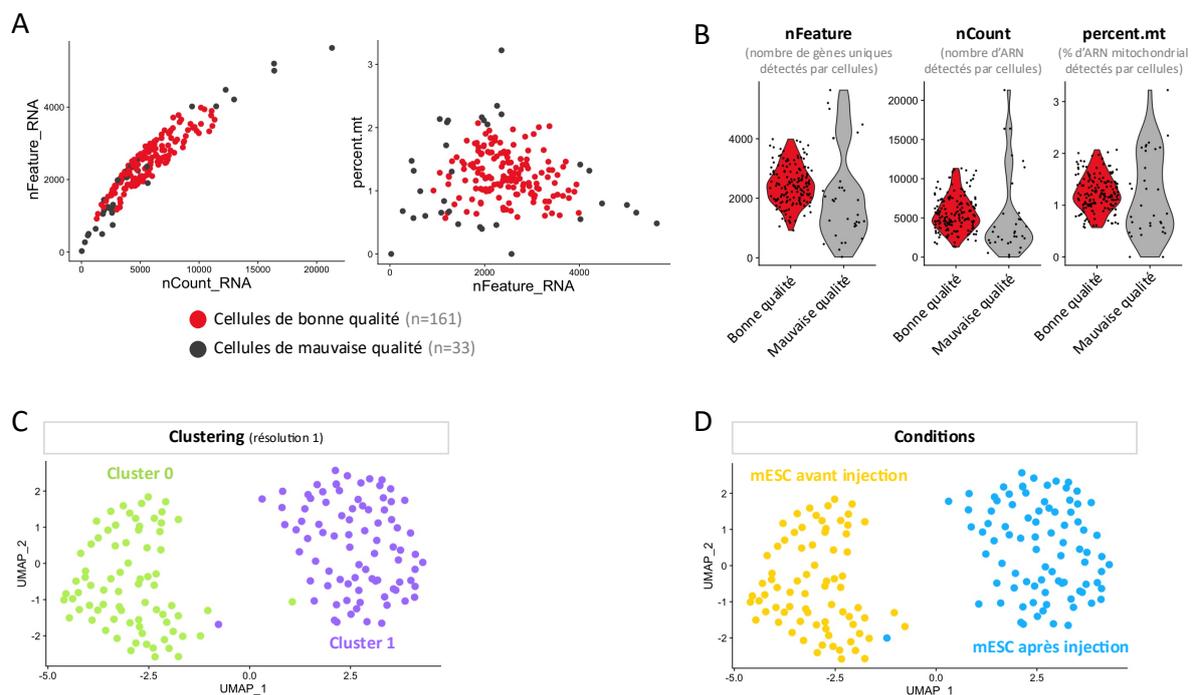


Figure 33 : Pre-processing des données de séquençage ARN sur cellule unique de la lignée cellulaire mESC LIF/FCS avant et après injection.

A) Scatter plot représentant chaque cellule du jeu de données en fonction du nombre de gènes uniques détectés (nFeature_RNA) et du nombre d'ARN capturés (nCount_RNA) ou du pourcentage d'ARN mitochondrial détecté (percent.mt) et du nombre de gènes uniques détectés (nFeature_RNA). **B)** Violin plots représentant le nombre de gènes uniques détectés (nFeature), le nombre d'ARN capturés (nCount) et le pourcentage d'ARN mitochondrial détecté (percent.mt) en fonction de la qualité des cellules du jeu de données. **C et D)** Feature plot des deux premières dimensions de UMAP en fonction C) des clusters identifiés lors du partitionnement des données (*clustering*) et D) de la condition expérimentale (avant ou après injection).

2.2.1. Sortie de la pluripotence naïve des PSC après injection

Je me suis d'abord intéressée au devenir des PSC après leur injection. Pour cela, J'ai intégré les données transcriptomiques des cellules chiPSC, avant et après injection, avec celles des embryons pré-implantatoires humains issues de l'étude de Stirparo *et al.* (2018) (Figure 34A). Ce jeu de données a l'avantage de fournir le transcriptome d'embryons humain dont la proximité évolutive avec le chimpanzé est élevée (divergence évolutive il y a 6,4 millions d'années) en l'absence de données transcriptomiques d'embryons précoces de chimpanzé, pour des raisons éthiques. L'analyse UMAP des deux premières dimensions révèle plusieurs *clusters* correspondant aux cellules de l'embryon humain à différents stades, notamment les cellules au stade 8-cellules, morula compactée, les cellules de l'ICM, ainsi que les cellules de l'épiblaste, et les cellules chiPSC avant et après injection (Figure 34A). Les cellules de l'épiblaste sont réparties en deux *clusters* distincts. Le premier (*cluster 1*) exprime des marqueurs d'épiblaste tels que *NANOG* et *SOX2*, mais aussi des marqueurs de l'endoderme primitif comme *SOX17* et *GATA4*, suggérant que ces cellules sont à un stade plus précoce, c'est-à-dire avant spécification complète de l'ICM. Le second *cluster* (*cluster 2*) exprime uniquement les marqueurs d'épiblaste, indiquant un stade de développement plus avancé après spécification de l'ICM (Figure 34B).

Le *cluster* formé par les cellules **chiPSC avant injection** se situe à proximité des populations de cellules au stade morula compactée et de l'ICM de l'embryon humain (Figure 34A). Le *cluster* composé des cellules **chiPSC après injection** est proche des deux *clusters* formés par les cellules de l'épiblaste humain mais aussi des cellules de l'embryon humain au stade 8-cellules. Ces résultats suggèrent qu'après injection les cellules chiPSC transitionnent vers un état de pluripotence moins immature.

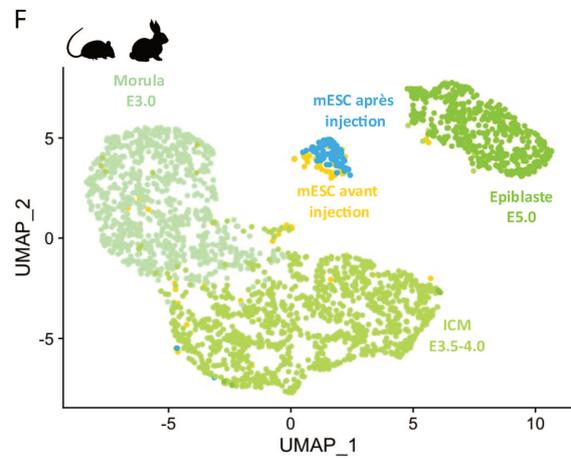
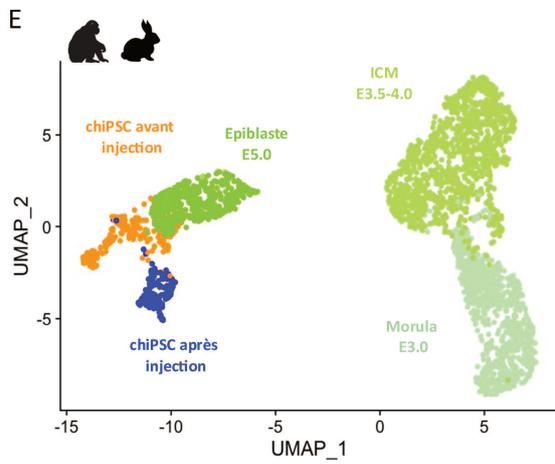
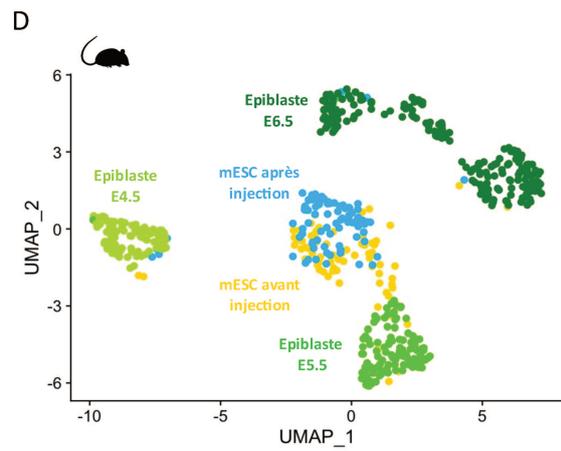
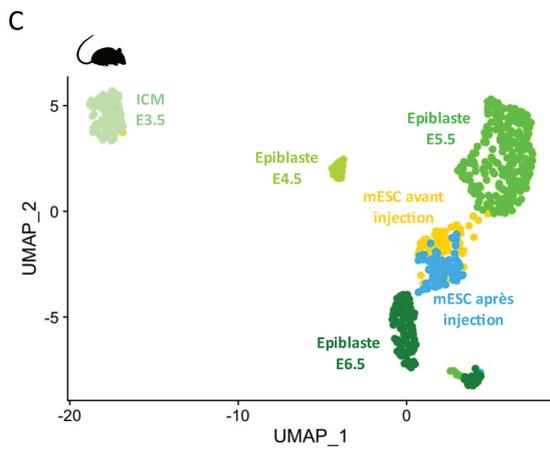
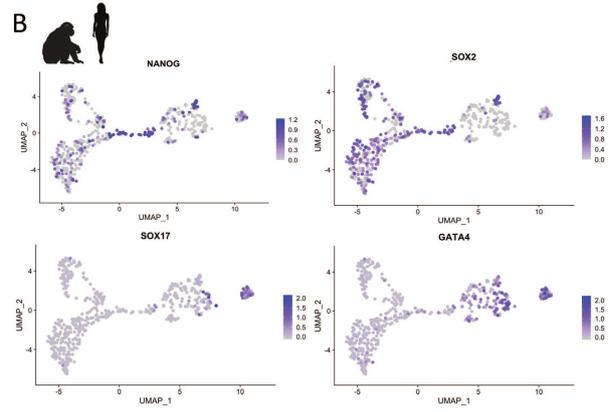
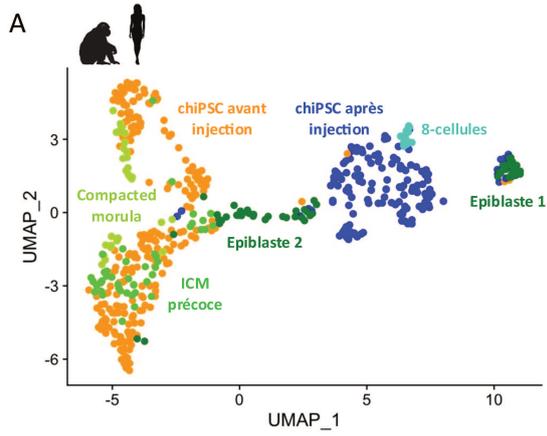
De manière similaire, j'ai intégré les données transcriptomiques des cellules mESC, avant et après injection, avec celles des embryons de souris pré- et post-implantatoires des études de Mohamed *et al.* (2017) et de Argelaguet *et al.* (2019) (Figures 34C et 34D). Les représentations UMAP en deux dimensions montrent différents *clusters* correspondant aux cellules de l'ICM et aux cellules de l'épiblaste pré- et post-implantatoire ainsi qu'aux cellules mESC avant et après injection. Dans les deux cas, le *cluster* formé par les cellules **mESC avant injection** est proche des populations de cellules de l'épiblaste pré-implantatoire (E4.5) et de l'épiblaste post-implantatoire à E5.5 (Figures 34C et 34D). Le *cluster* formé par les cellules **mESC après leur injection** est lui plus proche du *cluster* formé par les cellules de l'épiblaste post-implantatoire tardif (E6.5). Comme pour les cellules chiPSC, ces résultats suggèrent qu'après injection les cellules mESC transitionnent vers un état de pluripotence moins immature.

Enfin, étant donné que les cellules chiPSC et mESC sont injectées dans des embryons de lapin, j'ai réalisé une intégration de mes données avec les données transcriptomiques d'embryons de lapin de Bouchereau *et al.* (2022) (Figures 34E et 34F). Les représentations des deux premières dimensions de UMAP montrent différents *clusters* correspondant aux cellules de morula, de l'ICM, et de l'épiblaste ainsi qu'aux cellules chiPSC ou mESC avant et après injection. Les *clusters* formés par les cellules **chiPSC** avant et **après injection** sont proches du *cluster* formé par les cellules de l'épiblaste d'embryons de lapin à E5.0 (Figure 34E). Quant aux cellules **mESC**, celles avant injection sont positionnées entre les *clusters* des cellules de l'ICM et de l'épiblaste à E5.0, tandis que celles **après injection** se rapprochent des cellules de l'épiblaste à E5.0 (Figure 34F).

Ces résultats montrent qu'après injection, les cellules chiPSC et mESC passent à un stade développemental moins immature. De manière intéressante, les cellules mESC avant et après injection forment des *clusters* plus proches et montrent moins de variations globales du transcriptome par rapport aux cellules chiPSC dont les *clusters* avant et après injection sont plus éloignés.

Figure 34 : Les cellules chiPSC et mESC sont dans un état développemental moins immature après injection dans l'embryon de lapin.

A) *Feature plot* des deux premières dimensions de UMAP basé sur les données des cellules chiPSC avant et après injection intégrées aux données d'embryons humain (Stirparo *et al.*, 2018). **B)** *Feature plots* des deux premières dimensions de UMAP représentant l'expression des gènes *NANOG*, *SOX2*, *SOX17* et *GATA6* dans les données des cellules chiPSC intégrées aux données d'embryons humains. **C et D)** *Feature plot* des deux premières dimensions de UMAP basé sur les données des cellules mESC intégrées aux données d'embryons de souris C) de Mohammed *et al.* 2017 et D) de Argelaguet *et al.* 2019. **E et F)** *Feature plot* des deux premières dimensions de UMAP des données E) des cellules chiPSC ou F) des cellules mESC intégrées aux données transcriptomiques d'embryons de lapin (Bouchereau *et al.*, 2022).



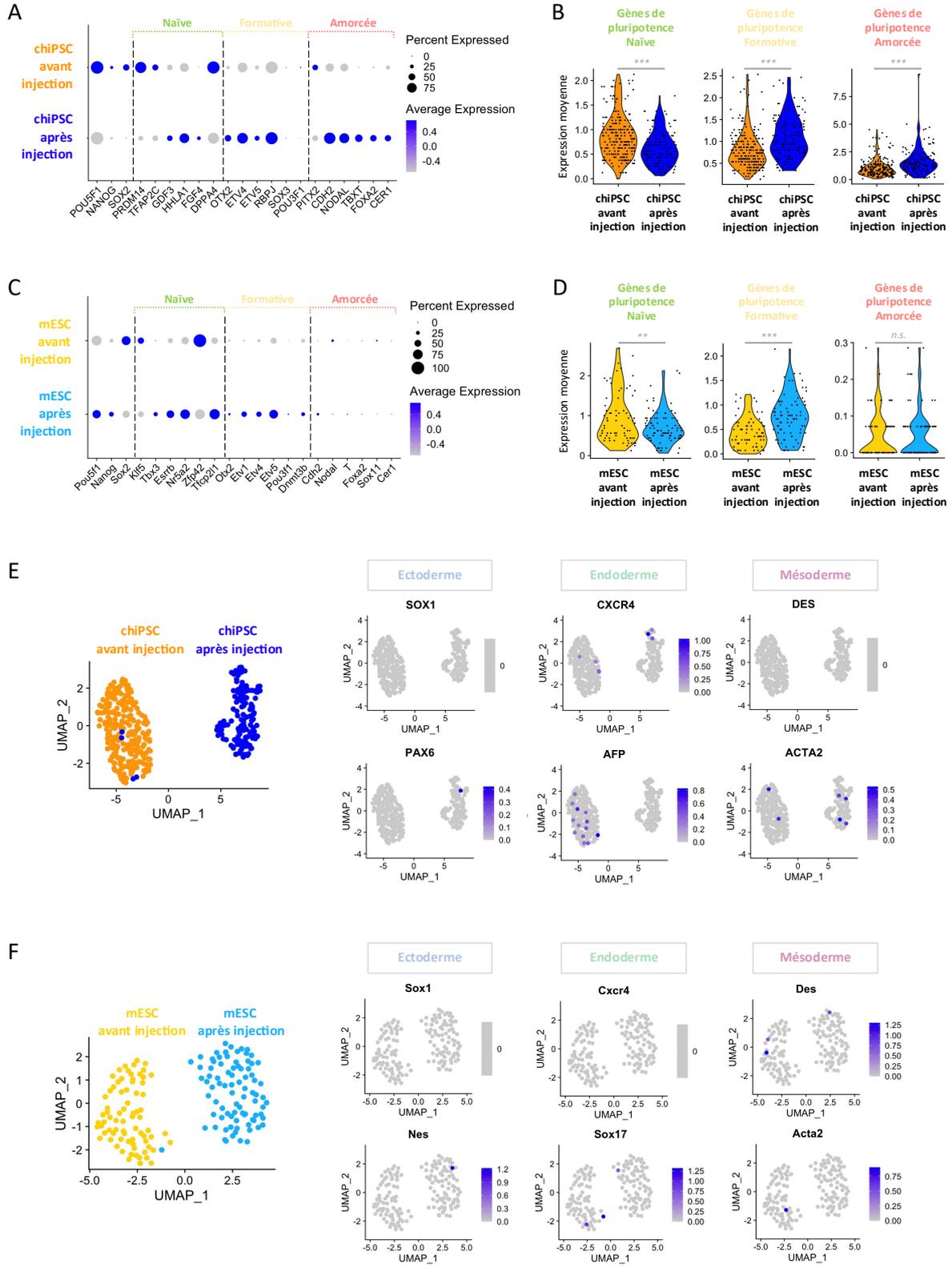
(Légende page précédente)

Je me suis ensuite intéressée à l'état de pluripotence des cellules chiPSC et mESC 48h après leur injection dans l'embryon de lapin. Pour cela, j'ai calculé la moyenne d'expression, par cellule, de listes de gènes associés aux différents états de pluripotence : naïve, formative et amorcée (Figures 35B et 35D). Cette analyse a révélé qu'après injection, pour les cellules mESC comme pour les cellules chiPSC l'expression moyenne des gènes associés à la pluripotence naïve diminue alors que l'expression moyenne des gènes associés à la pluripotence formative augmente (Figures 35A, 35B, 35C et 35D). Il est à noter que, contrairement aux cellules mESC, les cellules chiPSC montrent une augmentation moyenne de l'expression de gènes associés à la pluripotence amorcée tels que *CDH2* ou *NODAL* (Figures 35A et 35B). Par ailleurs, aucune des deux lignées cellulaires n'exprime de gènes associés à la différenciation vers les trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme) (Figures 35E et 35F).

L'ensemble de ces données montre que, 48 heures après injection dans l'embryon de lapin, les cellules chiPSC et mESC sortent de l'état de pluripotence naïve. Les mESC évoluent principalement vers un état de pluripotence formatif, tandis que les chiPSC tendent à progresser vers un état de pluripotence à la fois formatif et amorcé soulignant une différence dans leur dynamique de transition cellulaire.

Figure 35 : Les cellules chiPSC et mESC sortent de la pluripotence naïve après injection dans l'embryon de lapin.

A et C) Dot plot de l'expression de gènes associés à la pluripotence dans A) les cellules chiPSC et C) les cellules mESC avant et après injection. **B)** Violin plots de l'expression moyennée de 17 gènes de pluripotence naïve (*PRDM14, TFAP2C, GDF3, HHLA1, FGF4, DPPA4, KLF17, ST6GAL1, ALPPL2, TFPC2L1, DPPA5, DNMT3L, SUSP2, CD7, DPPA3, ARGFX, TBX3*), de 15 gènes de pluripotence formative (*OTX2, ETV4, ETV5, RBPJ, SOX3, POU3F1, SOX11, DNMT3B, DNMT3A, SALL2, ZIC2, ZIC3, ZIC5, LEF1, ZNF560*) et de 15 gènes de pluripotence amorcée (*PITX2, CDH2, NODAL, TBXT, FOXA2, CER1, EOMES, DKK1, CD24, FGF5, BMP4, LEFTY1, THY1, DUSP6, ACTA2*) dans les cellules chiPSC (*t-test*, ** p-value<0,01, *** p-value<0,001). **D)** Violin plots de l'expression moyennée de 17 gènes de pluripotence naïve (*Zfp42, Tfcp2l1, Klf2, Esrrb, Klf4, Klf5, Tbx3, Nr5a2, Il6st, Lifr, NrOb1, Stat3, Prdm14, Dppa3, Tdgf1, Fxbo15, Gbx2*), de 15 gènes de pluripotence formative (*Oxt2, Etv4, Etv5, Etv1, Pou3f1, Dnmt3b, Sox3, Dnmt3a, Zic2, Zic3, Sall2, Zic5, Rbpj, Lef1, Sox11*) et de 15 gènes de pluripotence amorcée (*Cdh2, Nodal, T, Foxa2, Sox11, Cer1, Eomes, Lefty1, Lefty2, Fst, Sox9, Sox1, Fgf5, Acta2, Dkk1*) dans les cellules mESC (*t-test*, *** p-value<0,001, n.s : non significatif). **E et F)** Feature plots des deux premières dimensions de UMAP et l'expression des marqueurs des trois feuilletts embryonnaires dans E) les cellules chiPSC et F) les cellules mESC.



(Légende page précédente)

2.2.2. Métabolisme énergétique des PSC après injection

Des changements métaboliques importants surviennent lors de la transition de la pluripotence naïve vers la pluripotence amorcée (Zhou et al., 2012). Je me suis donc intéressée aux variations dans l'expression de gènes associés à la glycolyse et à la phosphorylation oxydative dans les cellules chiPSC et mESC avant et après leur injection.

Concernant la glycolyse, j'ai calculé l'expression moyenne par cellule des gènes codant les enzymes responsables des différentes étapes clés telles que *PGAM1*, *ENO1* et *PKM* (Figures 36B et 36D). Dans le cas des cellules chiPSC comme des cellules mESC, **après injection**, on observe une diminution significative de l'expression moyenne de ces gènes (Figures 36A, 36B, 36C et 36D).

Pour la phosphorylation oxydative, j'ai calculé l'expression moyenne par cellule des gènes codant les enzymes des complexes de la chaîne respiratoire, tels que *NDUFS7*, *SDHC*, *CYC1*, *UQCR10*, *COX6A1* et *ATP5PB* qui sont essentiels à ce processus (Figures 36F et 36H). **Après injection**, on observe, les cellules chiPSC et les cellules mESC, une diminution de l'expression des gènes codant les enzymes des différents complexes de la chaîne respiratoire (Figures 36E, 36F, 36G et 36H).

Ces résultats suggèrent qu'après injection les cellules chiPSC comme les cellules mESC présentent une baisse simultanée de l'activité glycolytique et de la phosphorylation oxydative, suggérant une réduction globale de leur métabolisme énergétique.

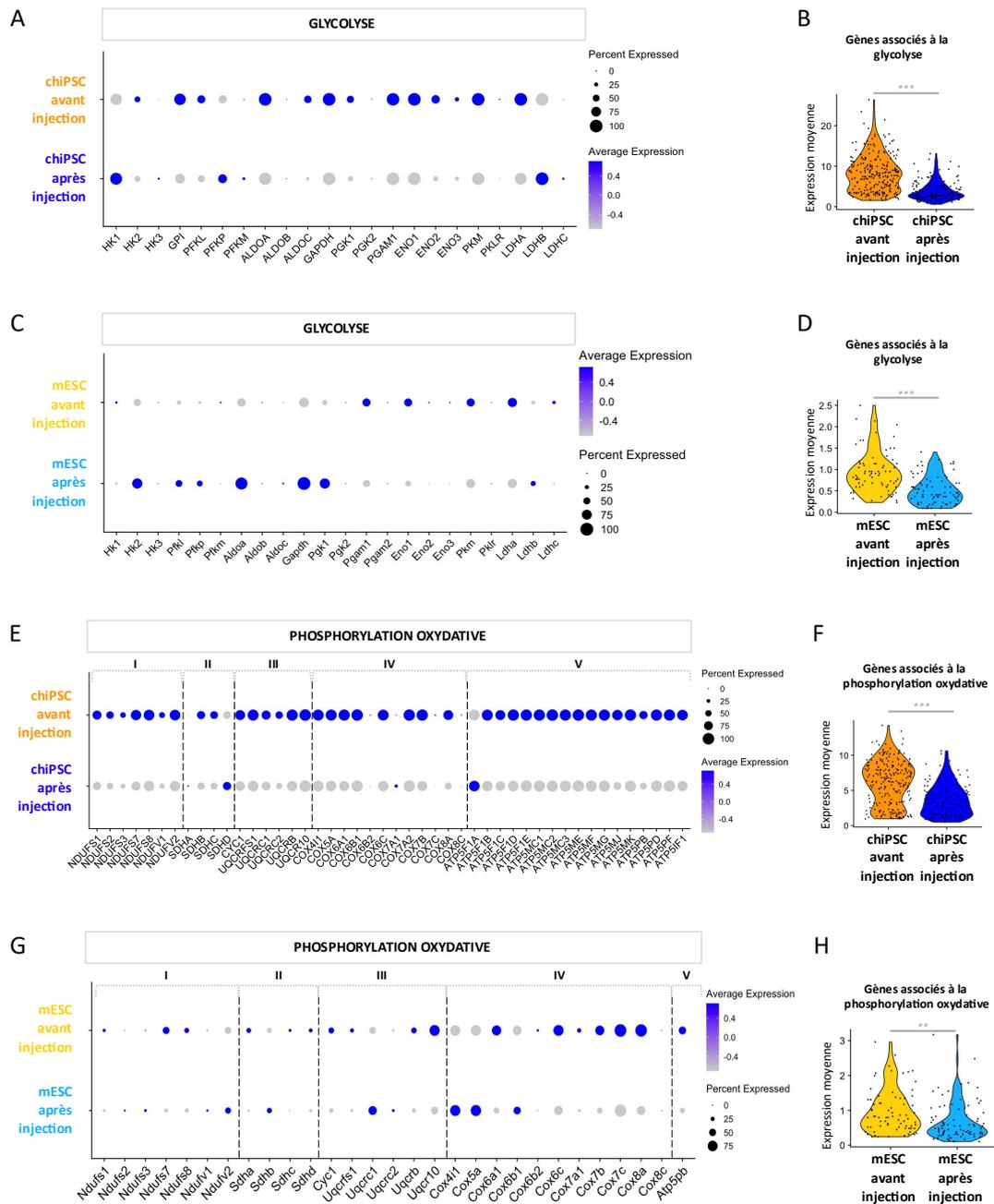


Figure 36 : Les cellules chiPSC et mESC réduisent leur métabolisme énergétique lors de la colonisation de l'embryon de lapin.

A et C) Dot plot représentant l'expression des gènes codant les enzymes de la glycolyse dans A) les cellules chiPSC et C) les cellules mESC, avant et après injection. **B et D)** Violin plots représentant l'expression moyenne des gènes codant les enzymes de la glycolyse, calculée à partir des listes des Figures 35A/C, dans B) les cellules chiPSC et D) les cellules mESC (*t-test*, *** p-value<0,001). **E et G)** Dot plot représentant l'expression des gènes codant les enzymes de la chaîne respiratoire dans E) les cellules chiPSC et G) les cellules mESC, avant et après injection. **F et H)** Violin plots représentant l'expression moyenne des gènes codant les enzymes de la chaîne respiratoire, calculée à partir des listes des Figures 35E/G, dans F) les cellules chiPSC et H) les cellules mESC (*t-test*, *** p-value<0,001, ** p-value<0,01).

2.2.3. Modifications du cycle cellulaire des PSC après injection

En 2021, Aksoy et al. ont montré que les PSC de primates naïves (macaque rhésus), incapables de coloniser, s'arrêtent en phase G1 du cycle cellulaire après leur injection dans l'embryon pré-implantatoire de lapin (Aksoy et al., 2021). De ce fait, j'ai examiné les variations du cycle cellulaire des cellules chiPSC et mESC après leur injection dans les embryons.

J'ai utilisé une fonction du *package* R Seurat, qui propose un outil d'annotation des différentes phases du cycle cellulaires basé sur l'expression de marqueurs des phases G1, S et G2/M (Figures 37A et 37C). Cette analyse a révélé une augmentation de la proportion de cellules **chiPSC et mESC** en phase G1 **après injection** (Figures 37B et 37D). Cette augmentation s'accompagne d'une hausse de l'expression des gènes codant les Cyclines D, associées à la phase G1 du cycle cellulaire, tel que *CCND1/2* pour les cellules chiPSC et *Ccnd1/3* pour les cellules mESC (Figures 37E, 37F, 37G et 37H).

De plus, j'ai observé une baisse de l'expression des cofacteurs associés aux cyclines D, tels que CDK6 pour les chiPSC et Cdk4/6 pour les mESC (Figures 37E, 37F, 37G et 37H) ainsi qu'une diminution de la proportion de cellules en phase G2/M **après injection** (Figures 37B et 37D). Dans ce contexte, les cellules mESC réduisent l'expression de *Ccnb1*, qui code pour la Cycline B1, associée à la phase G2/M (Figures 37G et 37H). Elles augmentent également l'expression de *Wee1*, un régulateur négatif de l'entrée en mitose (phase M). De plus, l'expression du cofacteur de la Cycline B1, CDK1, diminue dans les cellules chiPSC et mESC (Figures 37E, 37F, 37G et 37H).

Ces résultats suggèrent que les cellules chiPSC et mESC ralentissent leur cycle cellulaire, avec une augmentation de la proportion de cellules en phase G1 et une diminution de celles en phase G2/M.

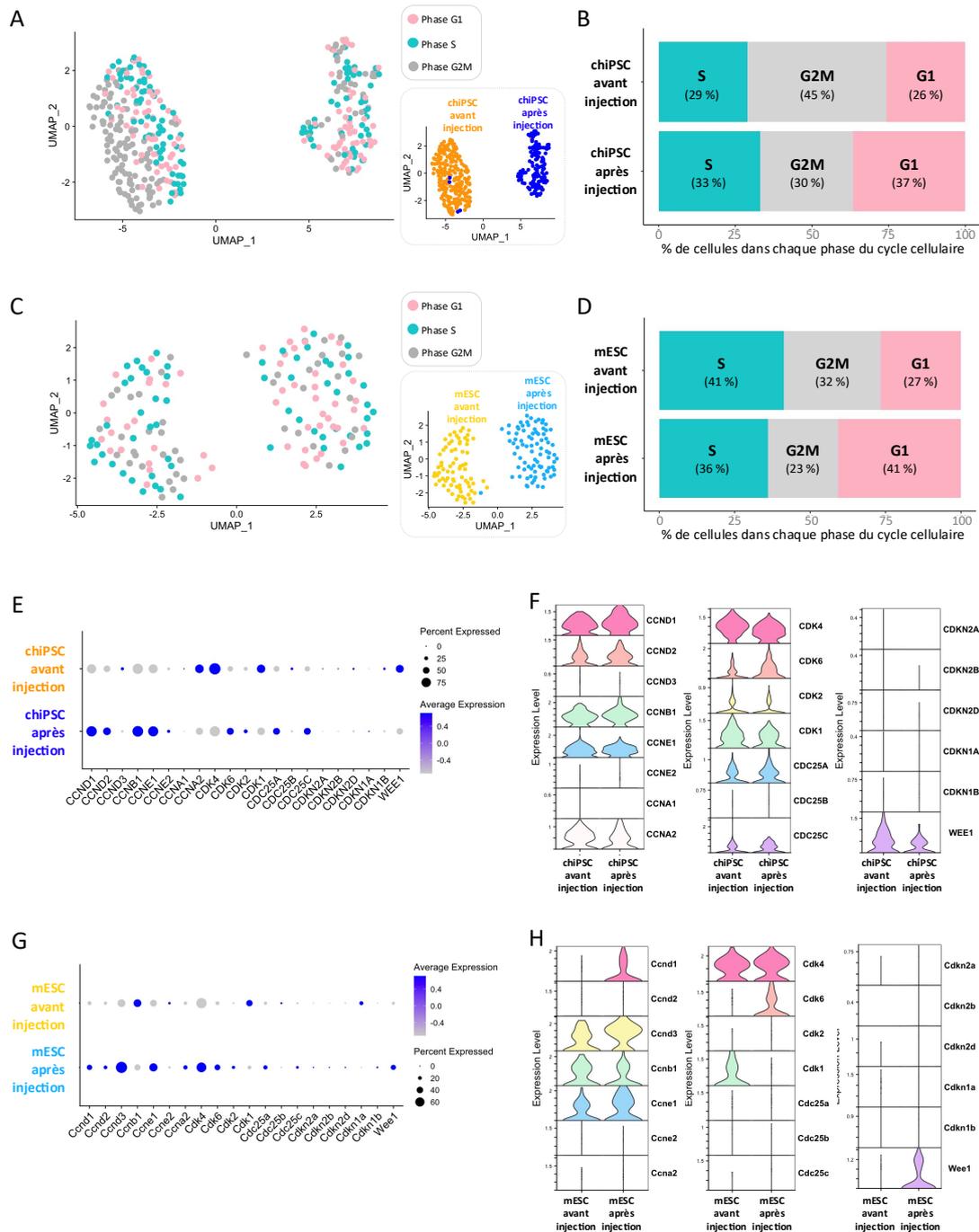


Figure 37 : Les cellules chiPSC et mESC ralentissent leur cycle cellulaire lors de la colonisation de l'embryon de lapin.

A et C) Feature plot des deux premières dimensions de UMAP et représentant les différentes phases du cycle cellulaire des cellules A) chiPSC et C) mESC. **B et D) Diagramme en barre** représentant les proportions de chaque phase du cycle cellulaire dans les populations cellulaires B) chiPSC et D) mESC, avant et après injection. **E et G) Dot plot** de l'expression des gènes codant différents régulateurs du cycle cellulaire (Cyclines, CDK, CDC25, CDKN) dans E) les cellules chiPSC et G) les cellules mESC, avant et après injection. **F et H) Violin plots** représentant l'expression des gènes codant différents régulateurs du cycle cellulaire (Cyclines, CDK, CDC25, CDKN) dans F) les cellules chiPSC et H) les cellules mESC.

2.2.4. Survie des PSC après injection

Il a été montré que la surexpression de facteurs anti-apoptotiques dans les PSC incapables de coloniser améliorait leur capacité à coloniser (Masaki et al., 2016; Aksoy et al., 2021). Sur cette base, j'ai analysé l'expression moyenne par cellule des gènes anti- et pro-apoptotiques dans les cellules chiPSC et mESC avant et après leur injection (Figures 38B et 38D).

Après injection, les cellules **chiPSC** montrent une augmentation de l'expression de gènes anti-apoptotiques comme *BCL2*, *BCL2L1*, *CFLAR* et *XIAP* (Figures 38A et 38B) tandis qu'aucun changement significatif n'a été observé dans l'expression des gènes pro-apoptotiques. En revanche, les cellules **mESC après injection** diminuent l'expression de gènes pro-apoptotiques tel que *Bax*, *Bad* ou *Hrk* (Figures 38C et 38D).

Ces analyses montrent que les cellules chiPSC et mESC adoptent des stratégies distinctes pour éviter l'apoptose après leur injection dans les embryons de lapin. Les cellules chiPSC augmentent l'expression de gènes anti-apoptotiques, tandis que les cellules mESC réduisent l'expression de gènes pro-apoptotiques. Ces mécanismes permettent aux deux types cellulaires de maintenir leur survie après injection et donc de coloniser l'embryon.

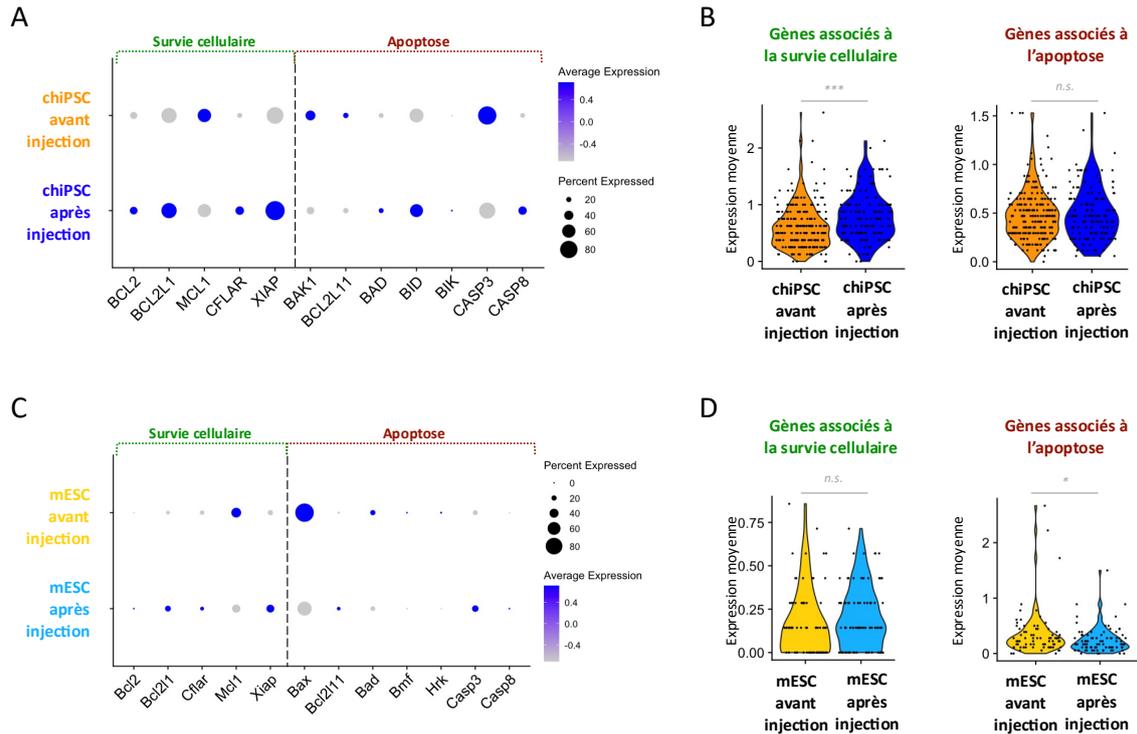


Figure 38 : Les cellules chiPSC et mESC évitent l'apoptose lors de la colonisation de l'embryon de lapin.

A et C) Dot plot de l'expression de gènes associés à la survie cellulaire et à l'apoptose dans A) les cellules chiPSC et C) les cellules mESC. **B et D)** A gauche : Violin plots représentant l'expression moyenne de gènes associés à la survie cellulaire et calculée à partir d'une liste de 8 gènes anti-apoptotiques (*BCL2*, *BCL2A1*, *BCL2L10*, *BCL2L1*, *RELA*, *CFLAR*, *MCL1*, *XIAP*) dans B) les cellules chiPSC et D) les cellules mESC. A droite : Violin plots représentant l'expression moyenne de gènes associés à l'apoptose et calculée à partir d'une liste de 18 gènes pro-apoptotiques (*AIFM1*, *BAD*, *BAK1*, *BAX*, *BBC3*, *BCL2L11*, *BID*, *BIK*, *BMF*, *CASP3*, *CASP6*, *CASP7*, *CASP8*, *DIABLO*, *GZMB*, *HRK*, *PARP4*, *PMAIP1*) dans B) les cellules chiPSC et D) les cellules mESC (*t*-test, *** p-value<0,001, *p-value<0,05, n.s. : non significatif).

2.2.5. Étude non biaisée du transcriptome des PSC de chimpanzé lors de la colonisation de l'embryon de lapin

Dans un second temps j'ai comparé le transcriptome global des cellules chiPSC avant et après injection et j'ai identifié les gènes différentiellement exprimés (DEG) entre ces deux populations.

J'ai obtenu une liste de 873 gènes dont l'expression est régulée à la hausse dans les cellules **chiPSC après injection** (Figure 39A). Une analyse des termes KEGG ainsi que des processus biologiques de la base de données *Gene Ontology* (GO) a été effectuée sur cette liste. Ces analyses ont révélé un enrichissement pour :

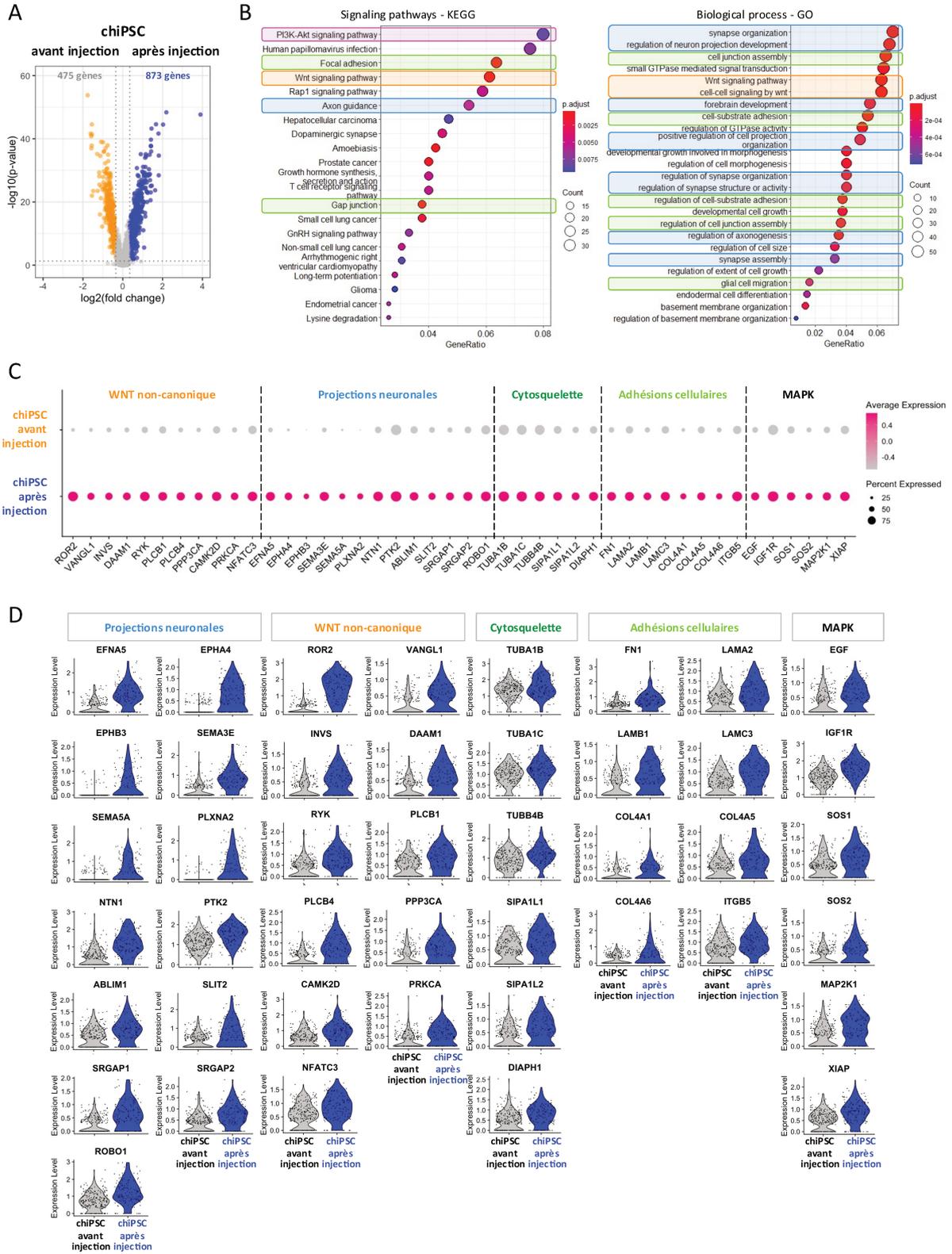
- la signalisation PI3K/AKT ;
- la signalisation WNT non-canonique, impliquée dans la polarité planaire via l'expression des récepteurs (*VANGL1*, *ROR2* et *RYK*) et des effecteurs (*INVS* et *DAAM1*) ;
- la signalisation WNT non-canonique calcium-dépendante avec l'expression de récepteurs (*RYK*) et effecteurs (*PLCB1*, *PLCB4*, *PPP3CA*, *CAMK2D*, *PRKCA*, *NFATC3* et *CAMK2D*) ;
- les gènes liés aux projections neuronales avec l'expression de ligands (*EFNA5*, *SEMA3E*, *SEMA5A*, *NTN1* et *SLIT2*), de récepteurs (*EPHA4*, *EPHB3*, *PLXNA2* et *ROBO1*) et d'effecteurs (*PTK2*, *ABLIM1*, *SRGAP1* et *SRGAP2*) des différentes voies éphrines, sémaphorines, nétrines, et SLIT/ROBO ;
- les gènes liés régulations du cytosquelette comme les tubulines (*TUBA1B*, *TUBA1C* et *TUBB4B*) ;
- les gènes liés aux adhésions et jonctions cellulaires avec l'augmentation de l'expression de la fibronectine (*FN1*) ; des sous-unités de laminines (*LAMA2*, *LAMB1* et *LAMC3*) ; des collagènes (*COL4A1*, *COL4A5* et *COL4A6*) ; et une intégrine (*ITGB5*) (Figures 39B, 39C et 39D).
- les gènes impliqués dans la voie MAPK/ERK tel que les effecteurs *SOS1*, *SOS2* et *MAP2K1/MEK1* (Figures 39C et 39D).

Dans l'ensemble, ces résultats montrent qu'après injection, les cellules chiPSC activent l'expression de régulateurs du cytosquelette et activent les signalisations éphrines, sémaphorines, nétrines, SLIT/ROBO, WNT non-canoniques. De plus, les chiPSC activent les gènes liés aux jonctions et adhésions cellulaires. Comme souligné dans la partie 1.2.3. de la section Résultats, ces processus sont déjà spécifiquement modulés dans les cellules chiPSC

(V)ALGöX par rapport aux PSC de primates incapables de coloniser l'embryon. De plus, ces résultats suggèrent des modifications tridimensionnelles des cellules, ainsi que des interactions avec le microenvironnement, durant la colonisation de l'embryon hôte.

Figure 39 : Les cellules chiPSC régulent positivement les voies PI3K/AKT, WNT et MAPK ainsi que les projections neuronales, les adhésions cellulaires et le cytosquelette après injection dans l'embryon de lapin.

A) *Volcano plot* représentant les DEG entre cellules chiPSC après vs. avant injection. **B)** *Dot plots* représentant les termes KEGG et GO enrichis dans la liste des 873 gènes régulés à la hausse dans les cellules chiPSC après injection. Le cadre rose représente la signalisation PI3K/AKT, les cadres orange encadrent les termes liés à la signalisation WNT, les cadres verts entourent les termes liés aux jonctions/adhésions cellulaires et les cadres bleus correspondent aux termes liés aux projections neuronales. **C)** *Dot plot* et **D)** *Violin plots* de l'expression de gènes régulés à la hausse dans les cellules chiPSC après injection et impliqués dans les voies WNT non-canoniques, les projections neuronales, les régulations du cytosquelette, les adhésions cellulaires et la signalisation MAPK.



(Légende page précédente)

Suite à la comparaison du transcriptome global des cellules chiPSC avant et après injection, j'ai identifié une liste de 475 gènes dont l'expression est réprimée dans les cellules **chiPSC après injection** par rapport à celles avant injection (Figure 40A). À partir de cette liste, j'ai réalisé une analyse des termes KEGG et des processus biologiques GO. Cette analyse a révélé qu'après injection les cellules chiPSC diminuent l'expression de gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative et la glycolyse (Figure 40B). Ces résultats sont en adéquation avec les observations faites dans la partie 2.2.2. de la section Résultats.

Cette analyse a également révélé que les cellules chiPSC après injection répriment l'expression de 29 gènes codant des protéines de la grande sous-unité ribosomale 60S et de 22 gènes codant des protéines la petite sous-unité ribosomale 40S (Figures 40B et 40C). Après injection, les cellules chiPSC répriment également l'expression de *EIF2S2* codant la sous-unité beta du facteur eIF2 (Figures 40G et 40H). Ce facteur forme un complexe en interagissant avec la petite sous-unité ribosomale 40S et l'ARNt initiateur (MET-tRNAi), le rendant nécessaire à l'initiation de la traduction.

Par ailleurs, les cellules diminuent l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le *spliceosome* et l'épissage des ARN tel que *SNRPG*, *SNRPD2*, *SNRPF*, *SRSF9*, *TXNL4A*, *LSM4* et *LSM2* (Figures 40D et 40E).

Ces résultats indiquent que, suite à l'injection, les cellules chiPSC répriment significativement des gènes associés à la phosphorylation oxydative, à la glycolyse, et à des fonctions ribosomiques essentielles pour la traduction. La diminution de l'expression des gènes impliqués dans le *spliceosome* et l'épissage des ARN souligne également un impact potentiel sur la régulation post-transcriptionnelle. Ces changements suggèrent une reprogrammation métabolique et post-transcriptionnelle des chiPSC après injection, ce qui pourrait améliorer leur capacité de colonisation.

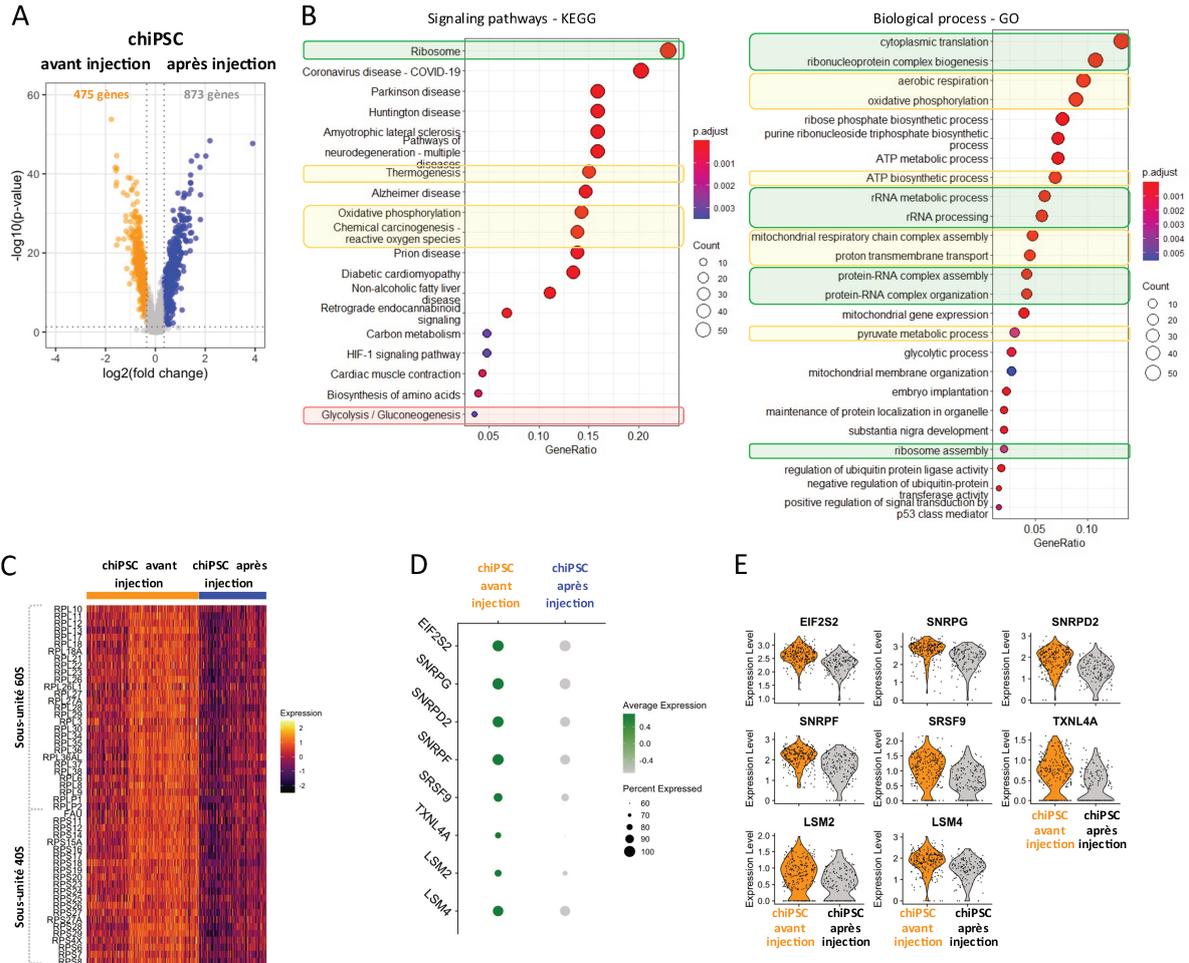


Figure 40 : Les cellules chIPSC régulent négativement la traduction protéique et le métabolisme énergétique après injection dans l’embryon de lapin.

A) Volcano plot représentant les DEG entre cellules chIPSC après vs. avant injection. **B)** Dot plots représentant les termes KEGG et GO enrichis dans la liste des 475 gènes réprimés dans les cellules chIPSC après injection. Les cadres verts encadrent les termes liés à la traduction, les cadres jaunes entourent les termes liés à la phosphorylation oxydative, et les cadres corail encadrent les termes liés à la glycolyse. **C)** Heatmap de l’expression des gènes codant les protéines de la grande et la petite sous-unité ribosomale dans les cellules chIPSC. **D)** Dot plot et **E)** Violin plots de l’expression des gènes réprimés dans les cellules chIPSC après injection et impliqués l’initiation de la traduction (*EIF2S2*) et l’épissage des ARN (*SNRPG*, *SNRPD2*, *SNRPF*, *SRSF9*, *TXNL4A*, *LSM4*, *LSM2*).

2.2.6. Étude fonctionnelle de la signalisation PI3K/AKT dans les PSC de chimpanzé lors de la colonisation de l'embryon de lapin

La signalisation PI3K/AKT est le terme KEGG le plus enrichi dans la liste de gènes activés dans les cellules **chiPSC après injection** (Figure 39B). Ceci résulte de l'augmentation de l'expression de plusieurs composants clés : la sous-unité catalytique p110 beta du complexe PI3K (*PIK3CB*), la sous-unité régulatrice p55 du complexe PI3K (*PIK3R3*), de la kinase AKT3 et des cibles des kinases AKT (*RPTOR*, *BRCA1*, *IKBKB* et *CREBL2*) (Figures 41A et 41B). De plus, nous avons montré dans la partie 1.2.3. de la section Résultats que les cellules chiPSC (V)ALGÖX activent spécifiquement AKT, contrairement aux PSC de primates incapables de coloniser l'embryon.

Suite à ces observations, nous avons injecté cinq à huit cellules chiPSC (V)ALGÖX GFP prétraitées 48h ou non à la *Wortmannin* (ou PIK3i), un inhibiteur irréversible du complexe PI3K, dans des morulas de lapin (Figure 41C). Après trois jours de culture *in vitro*, le taux de colonisation des embryons a été évalué par immunomarquages pour détecter la GFP uniquement exprimée par les cellules injectées. Les résultats ont montré une diminution drastique du nombre de cellules GFP+ dans les blastocystes injectés avec des cellules chiPSC prétraitées (7,92 cellules GFP+ par embryon) au PIK3i par rapport aux cellules chiPSC non-traitées (25,33 cellules GFP+ par embryon) (Figures 41D et 41E).

Ces résultats indiquent clairement que l'inhibition de la signalisation PI3K/AKT induit une diminution de la capacité de colonisation des cellules chiPSC après injection dans les embryons de lapin, démontrant le rôle crucial de cette voie de signalisation lors de la colonisation de l'embryon de lapin par les cellules chiPSC.

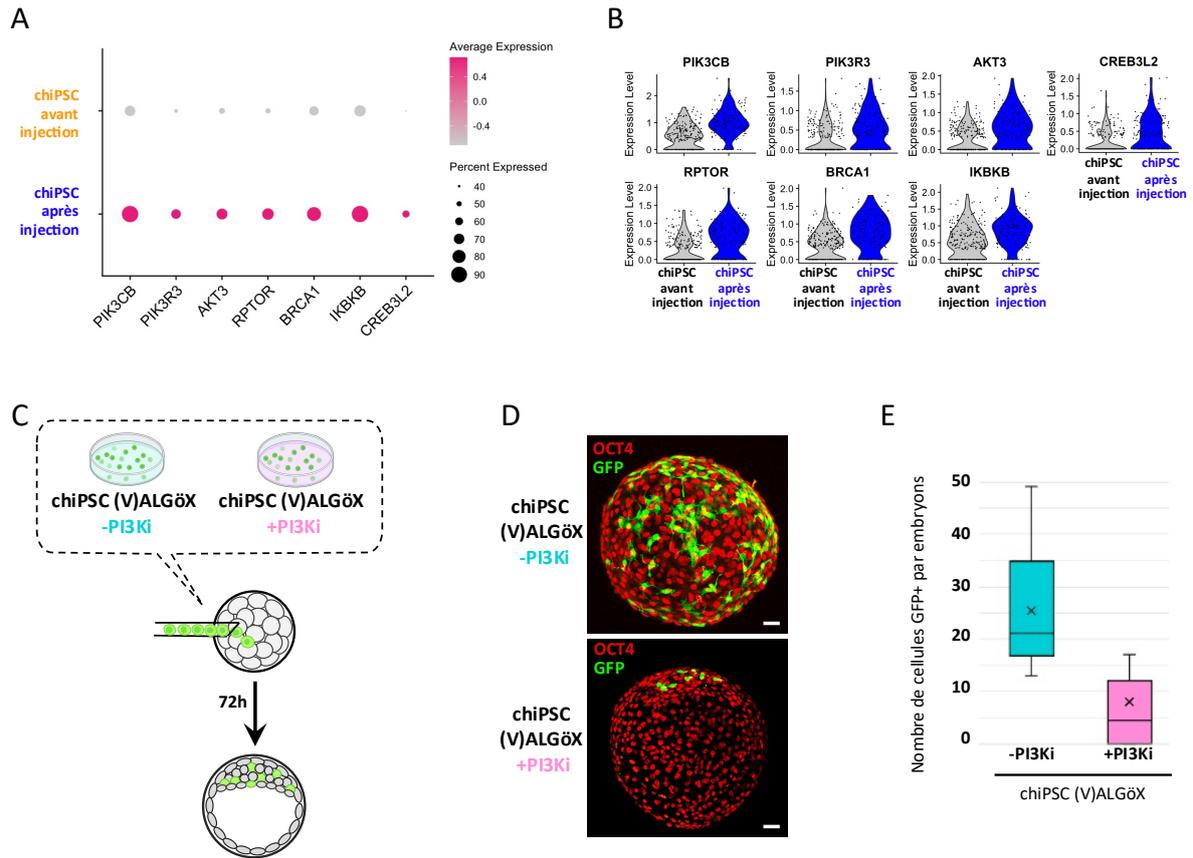


Figure 41 : Les cellules chIPSC-(V)ALGöX dépendent de la signalisation PI3K/AKT pour coloniser efficacement l'embryon de lapin.

A) Dot plot et B) Violin plots de l'expression des gènes régulés à la hausse dans les cellules chIPSC après injection et impliqués dans la voie de signalisation PI3K/AKT. **C) Plan expérimental** du test de colonisation de l'embryon de lapin avec les cellules chIPSC (V)ALGöX GFP prétraitées 48h (+PI3Ki) ou non à la Wortmannin (-PI3Ki), un inhibiteur irréversible du complexe PI3K. **D) Images de microscopie confocale** des immunomarquages de OCT4 et la GFP réalisés sur des blastocystes tardifs de lapin (E4.5-5.0, 3DIV) obtenus après microinjection des cellules chIPSC (V)ALGöX GFP prétraitées 48h (+PI3Ki) ou non à la Wortmannin (-PI3Ki). Barre d'échelle 50µm. **E) Boîtes à moustaches** représentant la distribution du nombre de cellules de primates GFP+ par blastocystes tardifs de lapin obtenus après microinjection des cellules chIPSC (V)ALGöX GFP prétraitées 48h (+PI3Ki) ou non à la Wortmannin (-PI3Ki).

2.2.7. Étude non biaisée du transcriptome des PSC de souris lors de la colonisation de l'embryon de lapin

Par la suite, j'ai comparé le transcriptome global des cellules mESC avant et après injection pour identifier les gènes différentiellement exprimés (DEG).

J'ai identifié 442 gènes régulés à la hausse dans les cellules **mESC après injection** par rapport aux cellules mESC avant injection (Figure 42A). J'ai ensuite réalisé une analyse des termes KEGG et des processus biologiques GO sur cette liste de gènes. Ces analyses ont montré un enrichissement pour :

- l'épissage des ARN (*Fus, Hnrnpa1, Hnrnpa3, Hnrnpc, Hnrnpk, Hnrnpu, Rbm25, Sf3b3, Snrnp70, Snrpa, Snrpd2, Srsf10, Tra2b, U2af2* et *Wbp11*) ;
- le remodelage de la chromatine avec l'expression d'enzyme de modification des histones (*Smyd3, Ehmt1, Kat6b*), d'ADN méthyltransférases (*Dnmt3a*), de protéines liées aux complexes SWI/SNF (*Arid1a, Smarcad1* et *Smarcc1*) ;
- les éléments du cytosquelette (*Actb, Actn4, Tuba1a* et *Tubb5*) et de leurs régulateurs (*Actr2, Cfl1, Cobl, Dst, Fscn1, Macf1, Ppp1r9a* et *Sipa1l3*) ;
- les voies de signalisation des Nétrines, des Sémaphorines et SLIT/ROBO (*Ntn1, Sema3e* et *Srgap2*) ;
- les adhésions cellulaires avec l'expression de molécules d'adhésion (*Cadm1, Pecam1*), de protéines de la matrice extracellulaire (*), de constituants des desmosomes (*Jup, Pkp4*) et de Pip5k1a impliquée dans l'assemblage des adhésions focales (Figures 42B, 42C et 42D).*

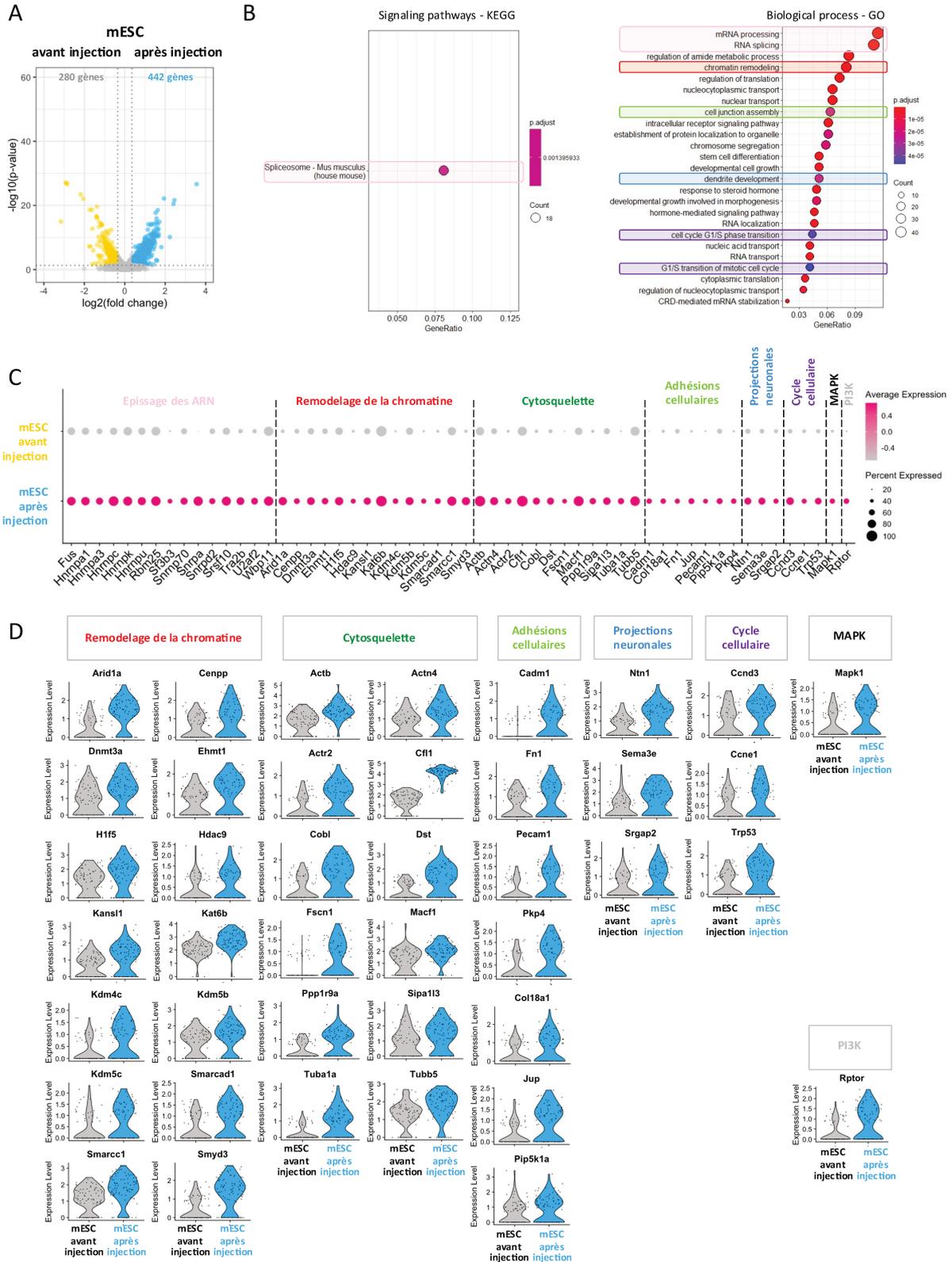
De plus, les cellules mESC augmentent également l'expression des gènes associés à la transition G1/S des phases du cycle cellulaire (Figure 42B). On retrouve le gène *Ccnd3* codant la Cycline D3 associée à la phase G1, le gène *Ccne1* codant la Cycline E1 associé à la phase S et le gène *Trp53* codant la protéine p53 régulant l'entrée en phase S (Figures 42C et 42D). Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus dans la partie 2.2.3 de la section Résultats. Il est intéressant de noter que, comme pour les cellules chiPSC après injection, les cellules mESC augmentent l'expression de l'effecteur de la signalisation MAPK *Mapk1/Erk2*; et du gène *Rptor* codant une cible de la voie de signalisation PI3K/AKT (Figures 42C et 42D).

Ces résultats révèlent qu'après injection, comme dans les cellules chiPSC, les cellules mESC activent l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette ainsi que dans les jonctions et adhésions cellulaires. Cela suggère des modifications de la forme et des interactions cellulaires pendant la colonisation de l'embryon. Ces résultats montrent

également qu'après injection, les cellules mESC activent l'expression de gènes liés à l'épissage des ARN et au remodelage de la chromatine, suggérant une activation de la transcription que l'on ne retrouve pas pour les cellules chiPSC.

Figure 42 : Les cellules mESC régulent positivement l'épissage des ARN, le remodelage de la chromatine, les projections neuronales, les adhésions cellulaires et le cytosquelette après injection dans l'embryon de lapin.

A) *Volcano plot* représentant les DEG entre cellules mESC après vs. avant injection. **B)** *Dot plots* représentant les termes KEGG et GO enrichis dans la liste des 442 gènes régulés à la hausse dans les cellules mESC après injection. Les cadres rose encadrent les termes liés à l'épissage des ARN, le cadre rouge souligne le terme lié au remodelage de la chromatine, le cadre vert encadre le terme lié aux adhésions cellulaires, le cadre bleu encadre le terme lié aux projections neuronales et les cadres violets entourent les termes liés cycle cellulaire. **C)** *Dot plot* et **D)** *Violin plots* représentant l'expression de gènes régulés à la hausse dans les cellules mESC après injection et impliqués dans l'épissage des ARN, le remodelage de la chromatine, les régulations du cytosquelette, les adhésions cellulaires, les projections neuronales, le cycle cellulaire et la signalisation MAPK.

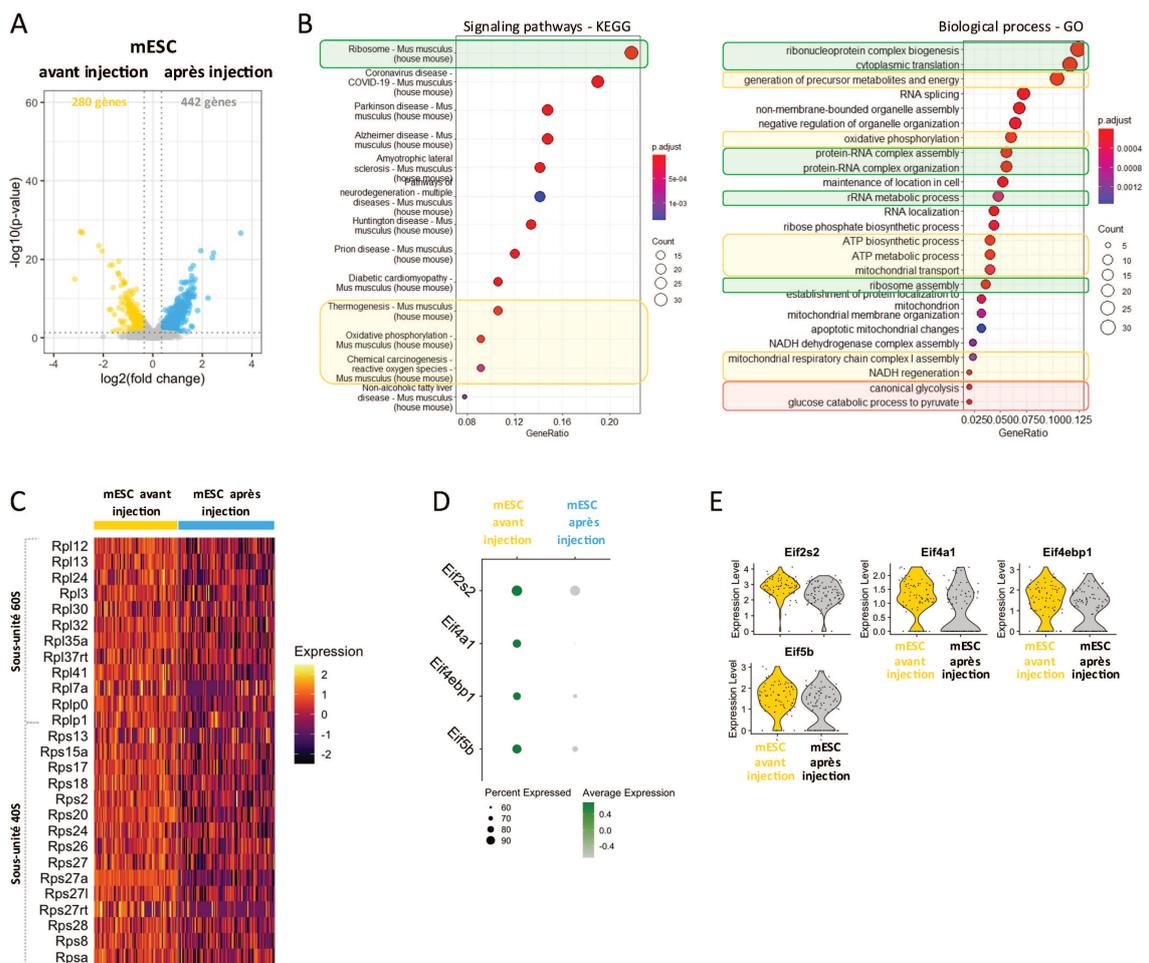


(Légende page précédente)

J'ai également réalisé les mêmes analyses sur la liste de 280 gènes identifiés comme réprimés dans les cellules mESC après leur injection (Figure 43A). L'analyse a révélé une diminution de l'expression des gènes associés à la phosphorylation oxydative et à la glycolyse (Figure 43B). Cet enrichissement est en adéquation avec les observations faites dans la partie 2.2.2 de la section Résultats pour les chiPSC.

L'analyse a également révélé une diminution de l'expression des gènes liés à la traduction protéique dans les cellules mESC après injection (Figure 43B). Ceci se traduit par la diminution de l'expression des gènes codant la grande sous-unité ribosomale 60S ainsi que la petite sous-unité ribosomale 40S (Figure 43C). De plus, les cellules mESC après injection diminuent l'expression des gènes *Eif2s2*, *Eif4a1*, *Eif4ebp1* et *Eif5b* (Figures 43D et 43E). Ces gènes codent des facteurs d'initiation de la traduction protéique qui interagissent avec les différentes sous-unités ribosomales.

Ces résultats révèlent qu'après injection les cellules mESC, comme les cellules chiPSC, répriment la traduction protéique et le métabolisme énergétique.



(Légende page suivante)

Figure 43 : Les cellules mESC régulent négativement la traduction protéique et le métabolisme énergétique après injection dans l'embryon de lapin.

A) *Volcano plot* représentant les DEG entre cellules mESC après vs. avant injection. **B)** *Dot plots* représentant les termes KEGG et GO enrichis dans la liste des 280 gènes réprimés dans les cellules mESC après injection. Les cadres verts encadrent les termes liés à la traduction, les cadres jaunes entourent les termes liés à la phosphorylation oxydative, et les cadres corail correspondent aux termes liés à la glycolyse. **C)** *Heatmap* de l'expression des gènes codant les protéines de la grande et la petite sous-unité ribosomale dans les cellules mESC. **D)** *Dot plot* et **E)** *Violin plots* de l'expression des gènes réprimés dans les cellules mESC après injection et impliqués l'initiation de la traduction.

2.2.8. Conclusions

Tous ces résultats démontrent qu'après injection les cellules chiPSC-(V)ALGÖX et les cellules mESC LIF/FCS :

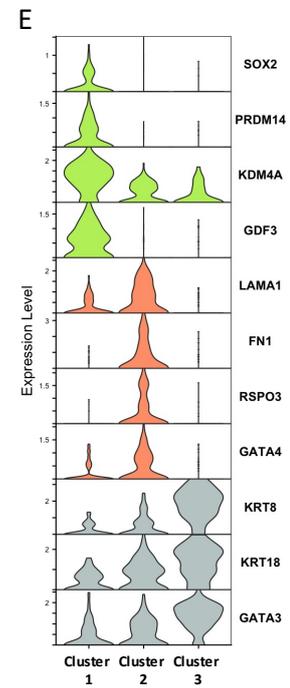
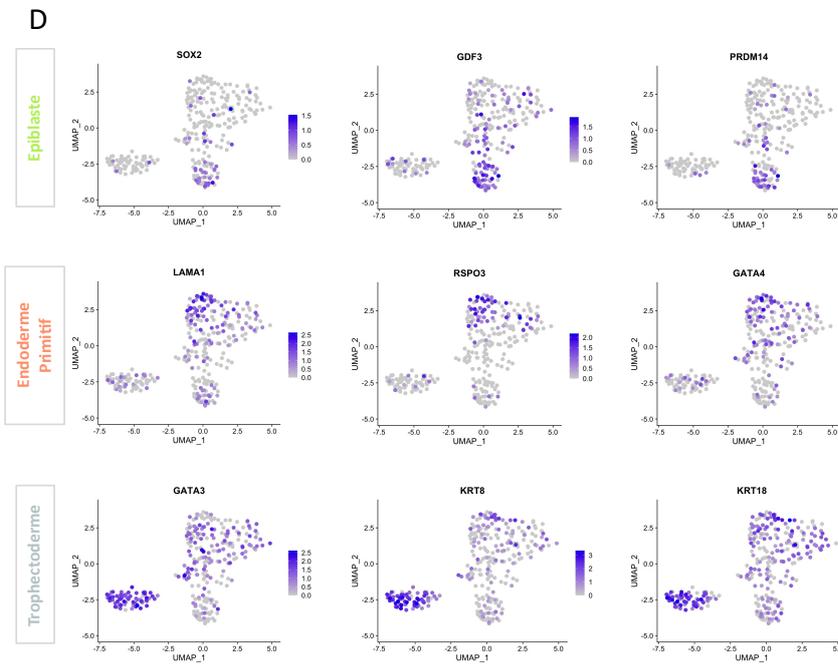
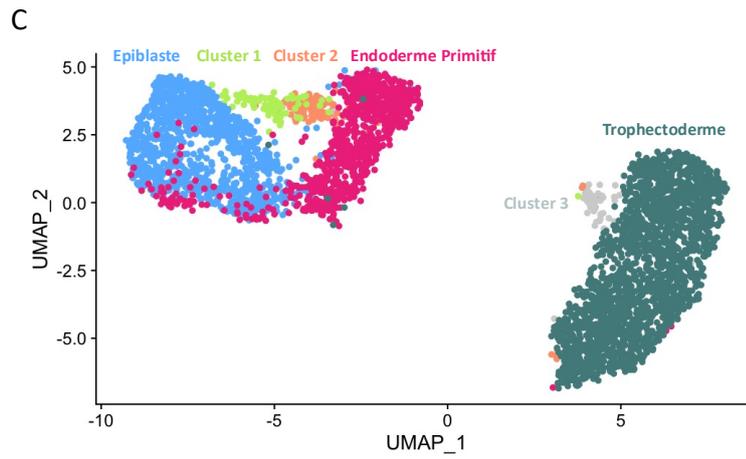
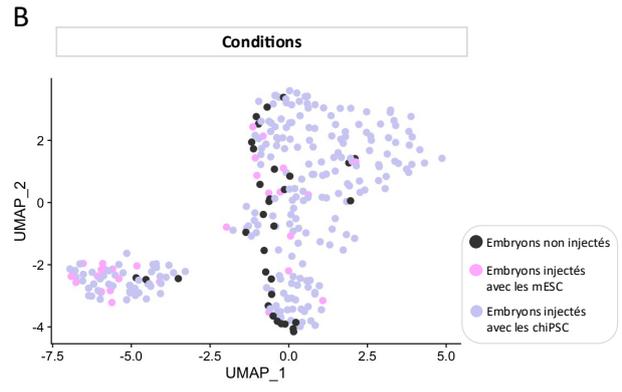
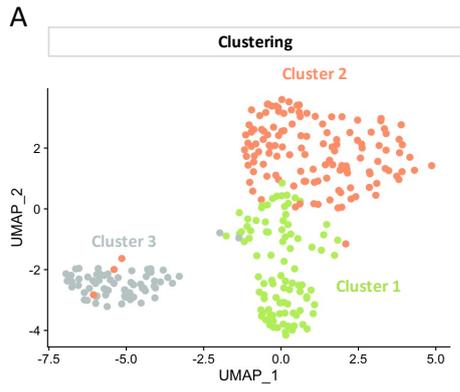
- i) sortent de la pluripotence naïve pour entrer dans un état de pluripotence en adéquation avec celui de l'embryon hôte,
- ii) restent plus fréquemment dans la phase G1 du cycle cellulaire au détriment de la phase G2/M,
- iii) activent les régulations du cytosquelette et des jonctions cellulaires,
- iv) régulent à la baisse leur métabolisme énergétique,
- v) répriment la traduction protéique.

Ces résultats révèlent également le rôle majeur de la signalisation PI3K/AKT dans les cellules chiPSC durant la colonisation de l'embryon de lapin.

2.3. Étude des changements transcriptomiques des cellules de l'embryon de lapin hôte durant la colonisation

Ayant à disposition le transcriptome des embryons injectés ainsi que celui d'embryons non-injectés, je me suis intéressée aux différences transcriptomiques concernant les embryons hôtes. Tout d'abord, j'ai réalisé un partitionnement des données (*clustering*) qui a abouti à trois *clusters* cellulaires différents observables sur la représentation des deux premières dimensions de UMAP (Figure 44A). On constate que chacun des trois *clusters* est constitué à la fois des cellules d'embryons non-injectés et injectés (Figure 44B). Cela indique que le transcriptome global des cellules d'embryon de lapin n'est pas affecté par l'injection de PSC.

Pour identifier ces trois *clusters*, j'ai intégré mes données avec celles d'embryons de lapin à E3.5-4.0 de l'étude de Bouchereau et al. 2022 (Figure 44C). La représentation des deux premières dimensions de UMAP montre différents *clusters* correspondant à l'épiblaste, l'endoderme primitif et le trophoctoderme de l'embryon de lapin aux stades E3.5-4.0, ainsi qu'au trois *clusters* identifiés dans nos données transcriptomiques (*cluster 1, 2 et 3*). Le *cluster 1* est proche de celui formé par les cellules de l'épiblaste, le *cluster 2* est proche de celui composé des cellules de l'endoderme primitif et le *cluster 3* est proche de celui formé par les cellules du trophoctoderme (Figure 44C). Les *clusters* formés durant le partitionnement dépendent donc des différents lignages présents dans l'embryon. En effet, les cellules du *cluster 1* expriment des marqueurs de l'épiblaste tel que *SOX2*, *PRDM14*, *GDF3* et *KDM4A*. Les cellules du *cluster 2* expriment des marqueurs de l'endoderme primitif (*LAMA1*, *RSPO3*, *GATA4* et *FN1*) tandis que les cellules du *cluster 3* expriment des marqueurs du trophoctoderme (*GATA3*, *KRT8* et *KRT18*) (Figures 44D et 44E). Ces résultats suggèrent que l'injection de PSC dans l'embryon de lapin n'impacte pas significativement l'identité des différents lignages.



(Légende page suivante)

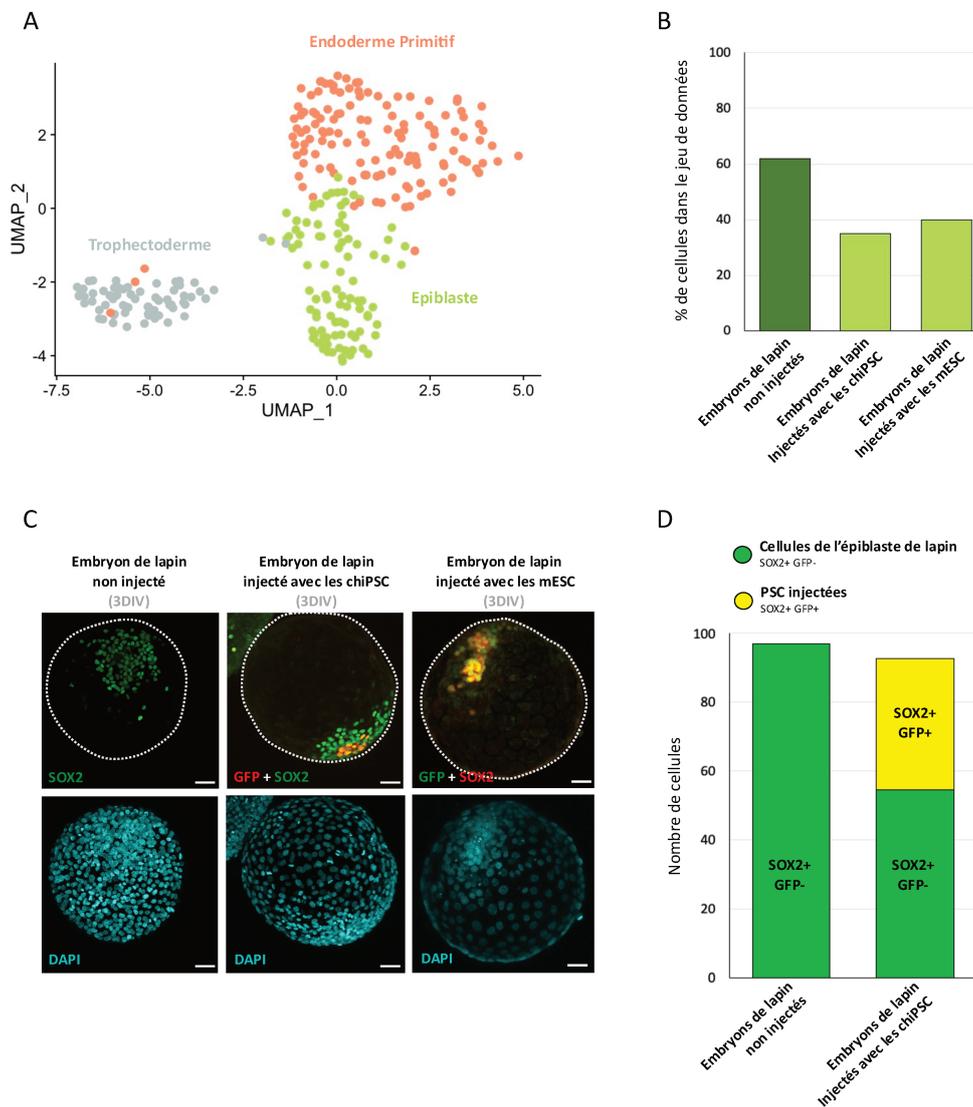
Figure 44 : Le transcriptome des embryons de lapin ne varie pas en réponse à l'injection de PSC de chimpanzé ou de souris.

A et B) *Feature plot* des deux premières dimensions de UMAP en fonction A) du partitionnement (*clustering*) et B) des conditions expérimentales des données relatives aux cellules des embryons de lapin injectées ou non avec les cellules chiPSC et mESC. **C)** *Feature plot* des deux premières dimensions de UMAP et représentant les données des cellules des embryons de lapin, injectées ou non, intégrées aux données d'embryons de lapin à E3.5-4.0 de Bouchereau et al. 2022. **D)** *Feature plots* des deux premières dimensions de UMAP et **E)** *Violin plots* représentant l'expression de marqueurs de l'épiblaste, de l'endoderme primitif et de marqueurs du trophoctoderme.

Il est à noter que la faible proportion de cellules du trophoctoderme est la conséquence de la dissection des embryons avant le séquençage (partie 2.1 de la section Résultats) (Figure 45A) et non d'une perturbation du ratio épiblaste, endoderme primitif et trophoctoderme dans les embryons qui pourrait être une conséquence de l'injection de cellules. On observe également que la proportion de cellules de l'endoderme primitif équivaut la proportion des cellules de l'épiblaste (Figure 45A). J'ai focalisé mon analyse sur la proportion de cellules de l'épiblaste dans les embryons injectés et non-injectés. Pour cela j'ai calculé, dans nos données transcriptomiques d'embryons de lapin, le pourcentage de cellules d'épiblaste par rapport au nombre total de cellules, en excluant les cellules de trophoctoderme, leur nombre étant biaisé par la dissection. J'ai observé une diminution du pourcentage de cellules de l'épiblaste dans les embryons de lapin injectés avec les cellules chiPSC et mESC (respectivement 35% et 40%) par rapport aux données d'embryons de lapin non-injectés (62%) (Figure 45B).

Pour valider cette observation, j'ai quantifié le nombre de cellules de l'épiblaste dans les embryons de lapin injectés avec des cellules chiPSC et dans les embryons non-injectés à l'aide d'immunomarquages SOX2 (marqueur de l'épiblaste) (Figure 45C). Ces comptages révèlent que le nombre total de cellules SOX2+ des embryons de lapin injectés et non-injectés ne varie pas (Figure 45D). Ceci suggère un équilibrage du nombre de cellules de l'épiblaste, malgré l'ajout de cellules exogènes. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai compté le nombre de cellules SOX2+ exprimant la GFP (SOX2+GFP+) afin d'identifier les cellules SOX2+ provenant des cellules chiPSC injectées (Figure 45C). J'ai ainsi observé une diminution du nombre de cellules de l'épiblaste de lapin (SOX2+GFP-) dans les embryons injectés par rapport aux non-injectés (Figure 45D). Ces résultats confirment un mécanisme de compensation dans l'épiblaste en réponse à l'injection de cellules exogènes. On observe un phénomène similaire après l'injection de cellules mESC dans l'embryon de lapin (Figure 45C). Ces résultats indiquent que le nombre de cellules de l'épiblaste hôte diminue et est compensé par les cellules chiPSC et mESC injectées, bien que le nombre de cellules de l'épiblaste des embryons ne varie pas.

En conclusion, contrairement au transcriptome des PSC, le transcriptome des embryons de lapin ne varie pas en réponse à l'injection de PSC. Ces résultats indiquent que les adaptations nécessaires à la colonisation de l'embryon de lapin sont supportées par les PSC injectées. En effet, les embryons de lapin semblent permissifs à la colonisation par des cellules PSC d'autre espèce et régulent le nombre de cellules de l'épiblaste en fonction du nombre de PSC colonisant l'épiblaste. Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes adaptatifs de l'embryon hôte face à l'injection des cellules chiPSC et mESC.



(Légende page suivante)

Figure 45 : Les cellules de l'épiblaste des embryons colonisés sont remplacées par les PSC de souris et de chimpanzé injectées.

A) *Feature plot* des deux premières dimensions de UMAP en fonction des différentes populations cellulaires des embryons de lapin injectées ou non. **B)** Pourcentage de cellules d'épiblaste, dans le jeu de données, par rapport au nombre total de cellules, en excluant les cellules de trophoctoderme. **C)** Images de microscopie confocale des immunomarquages de SOX2 et la GFP réalisés sur des blastocystes tardifs de lapin (E4.5-5.0, 3DIV) non-injectés et injectés avec des cellules chiPSC (V)ALGöX GFP ou mESC LIF/FCS GFP. Barre d'échelle 50µm. **E)** Diagramme en barre représentant le nombre de cellules de l'épiblaste issus de l'embryon de lapin (SOX2+ GFP-) ou des cellules chiPSC (SOX2+ GFP+) dans les blastocystes tardifs (3DIV) de lapin injectés ou non.

*

* *

Discussion

L'objectif du projet était de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la capacité des PSC à coloniser l'embryon pré-implantatoire. Au laboratoire, nous avons obtenu des lignées iPSC pseudo-naïves de lapin, appelées KEP_VALGÖX, cultivées en condition VALGÖX et surexprimant les transgènes humains *KLF2*, *ERAS* et *PRMT6*. Nous avons ensuite identifié une sous-population des cellules KEP_VALGÖX exprimant la protéine membranaire CD75 (KEPi_VALGÖX CD75^{high}) et colonisant très efficacement l'embryon de lapin, contrairement aux cellules KEP_VALGÖX. De plus, nous avons obtenu des lignées de PSC pseudo-naïves humaines, de chimpanzé, de macaque rhésus et de marmoset cultivées en condition (V)ALGÖX. Seule la lignée de PSC de chimpanzé (V)ALGÖX (chiPSC-(V)ALGÖX) colonise très efficacement les embryons de lapin. Nous avons ainsi pu étudier le transcriptome des PSC capables de coloniser chez le lapin et chez le primate (i.e. cellules KEPi_VALGÖX CD75^{high} et chiPSC-(V)ALGÖX) pour identifier les prérequis nécessaires à la capacité de colonisation.

1. Une approche non biaisée permettant d'identifier les mécanismes liés à la capacité de colonisation des PSC

A l'heure actuelle, les seules PSC capables de coloniser l'embryon, décrites dans la littérature, sont des PSC de rongeurs, lesquelles s'auto-renouvèlent à l'état naïf de pluripotence. Pour les caractériser, que ce soit au niveau transcriptomique ou protéique, ces PSC naïves sont comparées à des PSC dans l'état amorcé de pluripotence, cellules incapables de coloniser l'embryon. Il existe donc un biais ne permettant pas de dissocier la part du transcriptome impliquée dans l'acquisition et le maintien de l'état naïf de pluripotence de la part du transcriptome responsable de la capacité de colonisation. Nous avons donc développé une approche permettant d'isoler la signature transcriptomique des PSC capables de coloniser tout en limitant le biais dû à leur état de pluripotence.

Chez le lapin, la lignée d'iPSC KEPc_VALGÖX colonise l'embryon de lapin avec 63% d'embryons colonisés. J'ai cherché à identifier la signature transcriptomique spécifique de la capacité de colonisation de ces cellules. Pour cela, j'ai comparé leur transcriptome à celui des iPSC parentales (B19), dont elles dérivent, puis j'ai retiré des gènes différenciellement

exprimés ceux modulés par la surexpression des transgènes ou par la conversion en milieu VALGöX uniquement. Cette approche m'a permis d'obtenir une signature transcriptomique non biaisée par la reprogrammation en condition VALGöX et par la surexpression des transgènes. Pour affiner l'analyse, j'ai étudié le transcriptome de la sous-population KEPI_VALGöX CD75^{high}, isolée à partir des cellules KEPI_VALGöX, et capable de coloniser très efficacement l'embryon de lapin (100% d'embryons colonisés). J'ai alors comparé le transcriptome de cette sous-population avec celui de la population KEPI_VALGöX globale. Ces deux populations sont toutes deux cultivées dans les mêmes conditions (VALGöX) et s'auto-renouvellent dans l'état naïf de pluripotence. En réalisant cette comparaison, j'ai pu exclure le biais résultant de l'état de pluripotence et obtenir la signature transcriptomique de cellules capables de coloniser fortement l'embryon de lapin.

Toutefois, il est important noter que les cellules KEPI_VALGöX colonisent l'embryon, beaucoup moins efficacement que les cellules KEPI_VALGöX CD75^{high}. En effet, 35% des embryons injectés avec les cellules KEPI_VALGöX étaient colonisés avec en moyenne 6,5 cellules alors que 100% des embryons injectés avec les cellules KEPI_VALGöX CD75^{high} étaient colonisés avec en moyenne plus de 20 cellules. De ce fait, l'analyse transcriptomique de la sous-population KEPI_VALGöX CD75^{high} par rapport aux cellules KEPI_VALGöX exclut potentiellement une part de gènes, qui reste faible, impliqués dans la capacité à coloniser.

Chez le primate, la conversion des PSC d'Homme, de chimpanzé, de macaque rhésus et de marmoset en condition (V)ALGöX induit la reprogrammation des cellules dans un état de pluripotence pseudo-naïf. J'ai donc étudié le transcriptome d'iPSC de chimpanzé (V)ALGöX (chiPSC-(V)ALGöX), la seule lignée de PSC de primates capables de coloniser très efficacement l'embryon de lapin (96% des embryons colonisés). J'ai alors analysé l'effet de la conversion (V)ALGöX dans les quatre lignées de PSC de primates et j'ai isolé la signature transcriptomique spécifique de la conversion chez le chimpanzé. J'ai donc ainsi exclu de la signature transcriptomique des cellules chiPSC-(V)ALGöX, les gènes modulés par la conversion (V)ALGöX et communs avec au moins une autre lignée. En excluant ces gènes, j'ai pu obtenir la signature transcriptomique des chiPSC-(V)ALGöX associée à leur capacité de colonisation élevée et non biaisée par la reprogrammation vers l'état naïf due à la conversion en milieu (V)ALGöX.

Dans l'ensemble, grâce aux PSC de lapin et de primates obtenues au laboratoire et à la conception des analyses bioinformatiques, nous avons réussi à limiter les biais induits par l'état de pluripotence dans les listes de gènes différentiellement exprimés et à obtenir la signature transcriptomique liée à la capacité de colonisation des PSC. De plus, les PSC de chimpanzé (V)ALGöX obtenues au laboratoire, et capables de coloniser très efficacement l'embryon de lapin, nous ont permis d'étudier le transcriptome des cellules injectées et de l'embryon hôte pour identifier les mécanismes de la colonisation embryonnaire. Ainsi, nous

avons mis au point une approche efficace permettant d'identifier les mécanismes de la colonisation ainsi que leurs prérequis en minimisant le biais lié à l'état de pluripotence des cellules.

L'utilisation de cette approche non biaisée nous a permis de démontrer l'importance des signalisations liées aux interactions, à la survie et à la prolifération cellulaire pour une colonisation efficace de l'embryon par les PSC (Figure 47).

2. Compétition cellulaire et capacité de colonisation

La compétition cellulaire est un mécanisme clé dans le développement embryonnaire et la régulation des populations constituant les tissus, qui influence à la fois la survie des cellules et leur différenciation. Elle permet à certaines cellules de s'imposer en fonction de leur état compétitif, déterminé par les voies de signalisations impliquées dans la survie et la prolifération, mais également par leur état métabolique et épigénétique. On parle, pour l'ensemble de ces caractéristiques, de « *fitness* » cellulaire.

Lorsque nous générons des chimères, nous mettons en compétition les cellules injectées avec les cellules de l'embryon. Pour qu'il y ait colonisation, les deux systèmes doivent communiquer afin que la contribution des cellules injectées soit au moins aussi importante que celle des cellules de l'embryon hôte pour un développement réussi. Dans ma thèse, je me suis intéressée à deux types de chimères : les chimères intra-espèces lapin/lapin, et les chimères inter-espèces souris/lapin et chimpanzé/lapin. Il est important de noter que la barrière inter-espèce constitue un obstacle au chimérisme. En effet, les interactions ligands-récepteurs entre cellules d'espèces différentes sont plus difficiles, du fait de la distance phylogénétique, ce qui a pour effet probable de limiter les communications intercellulaires, et donc l'intégration des cellules injectées dans l'embryon hôte.

Les données que j'ai produites durant ma thèse montrent que les lignées mESC 2iLIF, KEpi_VALGÖX CD75^{high}, chiPSC-(V)ALGÖX partagent des signatures transcriptomiques similaires, avec des voies de signalisation communes telles que PI3K/AKT, NF-KB, la régulation de l'apoptose, toutes impliquées dans la compétition cellulaire. Cette convergence indique que, bien qu'issues de différentes espèces, ces cellules activent des mécanismes de survie et de prolifération similaires, leur conférant un avantage compétitif au sein de l'embryon.

2.1. Compétition cellulaire et capacité de colonisation : Implication de la voie NF- κ B

Dans le contexte de la compétition cellulaire, la voie NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) joue un rôle important dans la régulation de la survie et de l'inflammation. Chez la drosophile, cette voie joue un rôle clé dans la compétition cellulaire induite par les gènes *Myc* et *Minute* (Meyer et al., 2014; Baker, 2017). Récemment, l'équipe de Jun Wu a montré que son inactivation (grâce au *knock-out* de *P65* et de *MYD88*) améliore la survie des PSC humaines et accroît leur capacité à coloniser les embryons de souris (Zheng et al., 2021). En examinant l'état d'activation des voies P53 et NF- κ B dans des co-cultures et des cultures séparées de cellules iPSC humaines de type sauvage, MYD88KO, P53KO et P65KO, ils ont mis en évidence un axe MYD88–P53–P65 qui déclencherait la mort des PSC humaines lorsqu'elles entrent en compétition avec les PSC de souris.

J'ai identifié, dans la signature transcriptomique des cellules chiPSC-(V)ALGÖX, que plusieurs acteurs de la voie NF- κ B et de la régulation de TP53 sont moins exprimés que dans les cellules qui ne colonisent pas (hiPSC, maESC, rhESC). Cela pourrait indiquer un mécanisme adaptatif des cellules compétitives de chimpanzé qui tentent de coloniser l'embryon. Dans le cadre de la compétition cellulaire inter-espèces, souris/lapin et chimpanzé/lapin, la diminution de l'activité NF- κ B pourrait favoriser l'intégration des cellules injectées dans l'embryon hôte. En effet, lors de l'injection de cellules dans un embryon, une activation excessive de NF- κ B pourrait potentiellement entraîner l'exclusion des cellules injectées par des mécanismes pro-apoptotiques. La répression de cette voie permettrait donc aux cellules d'être moins perçues comme une menace par l'environnement embryonnaire, augmentant ainsi leur probabilité de coloniser l'embryon.

2.2. La signalisation PI3K/AKT est un acteur majeur de la colonisation embryonnaire

En comparant les signatures transcriptomiques des cellules mESC, KEPi_VALGÖX CD75^{high} et chiPSC-(V)ALGÖX, j'ai identifié la voie de signalisation PI3K/AKT qui est activée dans les trois espèces, souris, lapin et chimpanzé. De plus, le séquençage ARN sur cellule unique des blastocystes chimériques chimpanzé/lapin et souris/lapin a également révélé l'activation de la voie PI3K/AKT sur la base des changements transcriptionnels significatifs survenus dans les cellules. Nous nous sommes donc intéressés à cette voie et des tests fonctionnels réalisés

sur les chiPSC ont montré que l'inactivation de cette voie affecte de manière drastique leur capacité de colonisation (Figure 47).

La voie PI3K/AKT est une voie de signalisation clé impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires, notamment la prolifération, la survie, le métabolisme et la différenciation des cellules (Yu and Cui, 2016). Cette voie est souvent activée par des récepteurs de facteurs de croissance comme les récepteurs tyrosine kinase, et elle joue un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre entre la survie et l'apoptose dans les tissus.

2.2.1. La voie PI3K/AKT et l'apoptose

La protéine AKT est l'effecteur principal de la voie PI3K. Elle agit en aval pour inhiber plusieurs régulateurs pro-apoptotiques tels que BAD, et active des protéines anti-apoptotiques comme BCL2 ou MDM2 (O'Brien and Kirby, 2008; Yu and Cui, 2016). Par cette action, AKT empêche la libération du cytochrome c par les mitochondries, inhibant ainsi l'apoptose. Ce mécanisme a été mis en évidence lors de la formation des tissus embryonnaires, où les cellules qui ne remplissent pas les critères de qualité nécessaires sont éliminés (Wu et al., 2017; Wei et al., 2023). Dans les cellules maESC, rhESC et hiPSC, la voie PI3K/AKT est peu ou pas activée. Ces dernières sont donc plus susceptibles d'entrer en apoptose, ce qui expliquerait leur incapacité à coloniser l'embryon de lapin. L'activation de cette voie par surexpression d'un mutant AKT constitutivement actif ou par l'utilisation de petites molécules activatrices d'AKT pourrait conférer à ces cellules un avantage compétitif et les convertir en cellules dotées de capacité chimérique. Les expériences pour tester cette hypothèse sont actuellement en cours au laboratoire.

L'identification de gènes anti-apoptotiques tels que *BCL2* dans les analyses transcriptomiques des cellules KEPI_VALGÖX CD75^{high} et chiPSC-(V)ALGÖX renforce l'hypothèse selon laquelle ces cellules possèdent la capacité d'échapper aux mécanismes de mort cellulaire programmée. L'apoptose a été montré comme étant une barrière initiale au chimérisme inter-espèces. En effet, la surexpression de facteurs anti-apoptotiques, notamment *BCL2* et *BMI1*, améliore la capacité chimérique des cellules souches pluripotentes humaines amorcées et naïves dans les embryons précoces de souris, de lapin et de porc (Wang et al., 2018; Huang et al., 2018; Das et al., 2021; Aksoy et al., 2021). Nous étudions actuellement l'effet de l'utilisation d'inhibiteurs apoptotiques chimiques, tels qu'un inhibiteur des BAX ou de BIM, sur ces cellules.

2.2.2. La voie PI3K/AKT et la régulation du cycle cellulaire

La voie de signalisation PI3K/AKT est impliquée dans la régulation des différentes phases du cycle cellulaire notamment en induisant l'expression de la cycline D1, spécifique de la phase G1 (Kalous et al., 2023). Les modifications du cycle cellulaire observées dans les chiPSC et mESC injectées dans l'embryon de lapin révèlent un ralentissement de la vitesse de prolifération, avec notamment une augmentation de la proportion de cellules en phase G1. Ce ralentissement pourrait être un mécanisme régulé par la voie PI3K/AKT et permettant aux cellules injectées de s'adapter à leur environnement, d'éviter une entrée prématurée en mitose, et ainsi de maintenir leur capacité à coloniser l'épiblaste. En effet, l'équipe a montré que les mESC de souris sont plus sensibles aux signaux extérieurs en phase G1 que dans les autres phases du cycle cellulaire (Coronado et al., 2013).

2.2.3. La voie PI3K/AKT et le métabolisme

La signalisation PI3K/AKT apparaît comme un facteur central dans la régulation de la survie cellulaire et la colonisation. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de la voie de signalisation PI3K/AKT passant par mTOR dans la régulation des processus de prolifération, de différenciation et même de compétition cellulaire (Bowling et al., 2018). Elle joue un rôle central dans la régulation de la croissance et du métabolisme des cellules souches (Yu and Cui, 2016). Lorsque cette voie est activée, elle confère un avantage aux cellules en augmentant leur taux de prolifération et en renforçant leur résistance au stress métabolique. En revanche, les cellules ayant des défauts dans cette voie sont souvent éliminées par un processus de sélection intra-tissulaire (Bowling et al., 2018; Zhang et al., 2000). Les modifications transcriptomiques observées dans les cellules PSC après injection mettent notamment en lumière une reprogrammation métabolique importante. La réduction de l'expression des gènes associés à la glycolyse et à la phosphorylation oxydative, constatée aussi bien chez les chiPSC que les mESC, suggère une adaptation énergétique qui pourrait être cruciale pour leur survie dans l'environnement embryonnaire. Cette baisse du métabolisme énergétique pourrait correspondre à un état de quiescence transitoire, permettant aux cellules injectées de préserver leur énergie pour s'adapter à leur nouveau microenvironnement.

Dans le cadre de la compétition cellulaire, l'activation ou l'inhibition de la voie PI3K/AKT pourrait donc conférer un avantage ou un désavantage aux cellules en compétition,

déterminant ainsi leur survie et leur capacité à dominer les cellules voisines. Ce mécanisme semble être conservé dans l'ensemble des cellules analysées que ce soit lors de la reprogrammation des cellules ou après leur injection dans un embryon hôte. Ces observations renforcent donc l'idée que, malgré les différences inter-espèces, l'activation de la voie PI3K/AKT dans les PSC leur confère une forte capacité chimérique.

Nos résultats montrent que les PSC, bien qu'appartenant à différentes espèces, partagent des processus biologiques fondamentaux pour la colonisation embryonnaire, comme la signalisation PI3K/AKT et les adhésions cellulaires. Toutefois, la faible proportion de gènes partagés souligne que ces processus sont modulés différemment d'une espèce à l'autre. Les mécanismes adaptatifs, comme les altérations du cycle cellulaire et les stratégies de survie, apparaissent cruciaux pour la réussite de la colonisation et témoignent de la complexité des interactions entre les PSC et leur environnement embryonnaire.

3. Interactions cellulaires et capacité de colonisation

Les interactions cellulaires sont nécessaires à l'homéostasie des tissus via les protéines d'adhésions cellulaires qui permettent les interactions entre la cellule et son microenvironnement. La cellule peut alors intégrer les signaux extrinsèques qui induisent l'activation de signalisations intrinsèques, régulant majoritairement le cytosquelette, mais aussi des voies de signalisation liées à la survie et à la prolifération cellulaire (Yu and Cui, 2016). Lors de la microinjection des cellules dans un embryon, celles-ci se retrouvent dans un microenvironnement confiné et en trois dimensions. Leur adaptation à ce nouveau microenvironnement est cruciale pour la génération de chimères et passe par la détection du microenvironnement embryonnaire, comprenant les cellules adjacentes et la matrice extracellulaire, mais aussi par une réponse adaptée aux signaux détectés. Les analyses transcriptomiques menées au cours de ma thèse sur les cellules mESC 2iLIF, KEPi_VALGÖX CD75^{high}, chiPSC-(V)ALGÖX montrent que les trois lignées partagent une signature commune incluant des molécules impliquées dans les adhésions cellulaires, les régulations du cytosquelette ainsi que dans la signalisation Hippo.

3.1. Interactions cellulaires et régulation du cytosquelette

Lors des analyses transcriptomiques des PSC capables de coloniser chez le lapin, le primate et la souris, nous avons mis en évidence d'importantes modulations de l'expression des intégrines, des laminines, des éphrines et des sémaphorines, toutes impliquées dans les interactions cellulaires. De plus, nos analyses transcriptomiques des blastocystes chimériques chimpanzé/lapin et souris/lapin ont également montré une activation des voies éphrines, sémaphorines et des voies régulant le cytosquelette.

Les molécules d'adhésion cellulaire tel que les intégrines, mais également les éphrines et les sémaphorines, régulent le cytosquelette en réponses aux adhésions avec la matrice extracellulaire (pour les intégrines) et avec les cellules environnantes (pour les éphrines et les sémaphorines) (Arvanitis and Davy, 2008; Sakurai et al., 2012; Humphrey et al., 2014). La réorganisation du cytosquelette peut modifier la géométrie cellulaire et permettre son adaptation au microenvironnement (Saraswathibhatla et al., 2023). En effet, la déformabilité des cellules cancéreuses est associée à une capacité d'invasion élevée (Runel et al., 2021).

3.1.1. Les intégrines

Il a été montré que les intégrines, molécules d'adhésion à la matrice extracellulaire, sont impliquées dans les adaptations du cytosquelette en réponse aux changements d'élasticité de cette dernière (Saraswathibhatla et al., 2023), en induisant des mécanismes d'invasion et de migration cellulaire (Levental et al., 2009; Nordenfelt et al., 2016).

J'ai observé que plusieurs gènes codant pour des sous-unités d'intégrines étaient fortement transcrits dans les cellules mESC/2iLIF, KEpi_VALGÖX CD75^{high} et chiPSC-(V)ALGÖX. Quelques gènes d'intégrines étaient en revanche régulés à la baisse dans ces mêmes cellules. Ceci suggère de fines régulations transcriptionnelles au niveau des gènes codant les intégrines, permettant aux cellules d'être plus adaptables face aux changements du microenvironnement. En effet, les analyses transcriptomiques des chimères chimpanzé/lapin ont révélé une augmentation de l'expression, dans les chiPSC, de l'intégrine beta 5 (codé par *ITGB5*), gène dont l'expression est déjà activée dans les chiPSC (V)ALGÖX par rapport aux autres PSC de primates. Dans les cellules tumorales, l'expression de cette intégrine augmente la prolifération, l'invasion et la migration cellulaire (Bianchi-Smiraglia et al., 2013; Chen et al., 2024b).

3.1.2. Les éphrines

Les éphrines sont des molécules transmembranaires d'interactions cellulaires directes qui interagissent avec les récepteurs transmembranaires EPH portés par des cellules avoisinantes (Klein, 2012). La signalisation des éphrines est impliquée dans les régulations du cytosquelette permettant de moduler la motilité ainsi que la morphologie cellulaire (Kania and Klein, 2016). Cette voie de signalisation est également impliquée dans la prolifération, l'invasion et la migration tumorale (Arora et al., 2023). Mes analyses transcriptomiques ont révélé que les gènes codant l'Ephrine-A4 (*EFNA4*) sont régulés à la hausse dans les cellules mESC 2iLIF, KEPI_VALGöX CD75^{high} et chiPSC-(V)ALGöX. De plus, l'étude du transcriptome des chimères chimpanzé/lapin a révélé une activation de la signalisation des éphrines dans les cellules injectées. La surexpression tumorale de *EFNA4* entraîne une augmentation de la migration, de l'invasion et la prolifération cellulaire (Lin et al., 2021; Chen et al., 2021). Il a été observé, dans une co-culture d'iPSC de souris et iPSC humaines, que l'Ephrine A4 exprimée par les iPSC de souris induit l'apoptose des iPSC humaines via sa liaison au récepteur EPHA1 (Tanaka et al., 2024). Notons que les cellules des embryons de lapin injectés expriment également EPHA1 (Figure 46). Il est donc possible que les cellules mESC 2iLIF, KEPI_VALGöX CD75^{high} et chiPSC-(V)ALGöX exprimant *EFNA4* entrent en compétition avec les cellules de l'embryon. La signalisation des éphrines fonctionne également dans le sens inverse : la protéine EPH devient le ligand et active la protéine transmembranaire éphrine (Klein, 2012). Il serait intéressant de comprendre les mécanismes activés dans les cellules exprimant *EFNA4* et leur permettant de coloniser l'embryon de lapin.

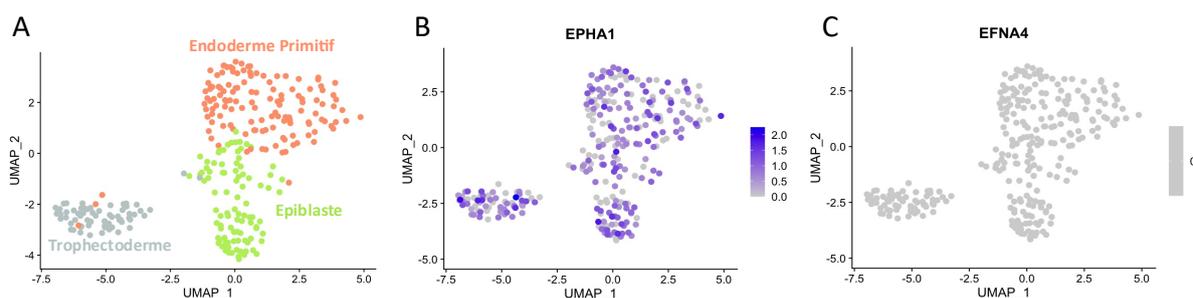


Figure 46 : Les embryons de lapin expriment le gène codant le récepteur EPHA1.

A) Feature plot des deux premières dimensions de UMAP en fonction des différentes populations cellulaires des embryons de lapin injectés ou non. **B et C)** Feature plots des deux premières dimensions de UMAP représentant l'expression du récepteur *EPHA1* et son ligand *EFNA4* dans les cellules des embryons de lapin injectés ou non.

3.1.3. Les sémaphorines

Les sémaphorines sont des protéines de surface solubles, impliquées dans le remodelage du cytosquelette, entraînant alors des modifications de la morphologie cellulaire (Sakurai et al., 2012). Mes analyses transcriptomiques ont montré que les cellules KEPI_VALGÖX CD75^{high} et chiPSC-(V)ALGÖX régulent à la hausse l'expression de la Sémaphorine-3E (codée par *SEMA3E*). De plus, nous avons montré que l'expression de cette sémaphorine est régulée à la hausse dans les cellules mESC et chiPSC-(V)ALGÖX après injection. La sémaphorine-3E appartient à la classe 3 des sémaphorines, seule classe à être sécrétée par les cellules, et interagit avec le récepteur Plexine-D1 (Sakurai et al., 2012). L'interaction de la Sémaphorine-3E avec son récepteur PLXD1, de manière autocrine, a été démontrée comme augmentant la capacité d'invasion et de migration des cellules cancéreuses (Casazza et al., 2010; Tseng et al., 2011). De plus, l'activation de la signalisation des sémaphorines dans les cellules ESC humaines, via PLXB2, permet de réorganiser le cytosquelette pour ajuster les tensions mécaniques liées à la croissance des colonies (Junqueira Alves et al., 2021).

3.1.4. La matrice extracellulaire

Nous avons montré que les cellules injectées augmentent l'expression de protéines de la matrice-extracellulaire. De manière intéressante, les cellules mESC 2iLIF, KEPI_VALGÖX CD75^{high} et chiPSC-(V)ALGÖX régulent à la hausse l'expression de la fibronectine 1 (codée par *FN1*), une protéine matricielle. De plus, l'étude du transcriptome des chimères chimpanzé/lapin et souris/lapin a également montré une augmentation de l'expression de cette protéine. Il a été montré que la fibronectine, associée à la laminine 511, améliore l'efficacité de dérivation d'ESC de souris à partir de blastocystes précoces, suggérant une implication de la composition de la matrice extracellulaire sur la survie des cellules (Boroviak et al., 2014). En effet, la composition de la matrice extracellulaire impacte son élasticité, propriété qui active des boucles de rétro-contrôle permettant la modulation de sa composition (Humphrey et al., 2014). De plus, les forces biomécaniques appliquées sur les cellules par la matrice extracellulaire modifient la tension de la membrane (Saraswathibhatla et al., 2023). Il a parallèlement été montré qu'une diminution de la tension de membrane dans les cellules ESC de souris modifie leur ancrage au cytosquelette d'actine et induit leur sortie de la pluripotence naïve (De Belly et al., 2021; Bergert et al., 2021). Il a également été montré que le transcriptome des cellules ESC de souris change lorsqu'elles sont cultivées en trois dimensions. Lors de la culture en trois dimensions, les cellules ESC de souris, alors confinées,

réactivent l'expression du gène codant la plakoglobine (*Jup*) (Kohler et al., 2023). La plakoglobine est spécifiquement exprimée au stade blastocyste de l'embryon de souris et l'embryon humain (Kohler et al., 2023). De plus, elle est impliquée dans le maintien de la pluripotence naïve (Kohler et al., 2023). Il est alors intéressant de noter que l'analyse du transcriptome des chimères souris/lapin a révélé une augmentation de l'expression de *Jup*, indiquant des adaptations aux tensions mécaniques lors de la colonisation de l'embryon.

Les forces mécaniques appliquées aux cellules dans l'embryon diffèrent de celles appliquées aux cellules en culture en deux dimensions (Saraswathibhatla et al., 2023). Notre étude révèle que la détection des changements biomécaniques, mais aussi les modifications adéquates du cytosquelette et des adhésions cellulaires, semblent nécessaires à l'adaptation des cellules microinjectées dans le microenvironnement embryonnaire pour une colonisation efficace (Figure 47).

3.2. Interactions cellulaires et signalisation Hippo

Mes analyses transcriptomiques sur les cellules mESC 2iLIF, KEPI_VALGÖX CD75^{high}, chiPSC-(V)ALGÖX montrent une diminution, commune aux trois lignées, de l'expression de *LATS2* et *CTNNA2* codant des protéines impliquées dans l'inhibition de YAP. Cette atténuation de la voie Hippo est impliquée dans la spécification des cellules de l'ICM en cellules de l'épiblaste et dans la compétition cellulaire prenant place dans l'embryon à ce moment (Hashimoto and Sasaki, 2019). Les forces appliquées sur les cellules par le microenvironnement induisent des modifications du cytosquelette, lesquelles contrôlent la voie Hippo et donc l'entrée dans le noyau de YAP activant des programmes transcriptionnels spécifiques (Dupont et al., 2011). De plus, l'activation de YAP a été démontrée comme étant associée à une prolifération et à une capacité d'invasion accrue des cellules cancéreuses (Zanconato et al., 2016). Dans nos travaux, l'analyse du transcriptome des chimères chimpanzé/lapin et souris/lapin n'a pas montré de réactivation de la signalisation Hippo. Ce maintien de l'activation de YAP dans les cellules après injection peut être dû aux signaux biomécaniques du microenvironnement embryonnaire. L'activation de YAP semble, de ce fait, être un élément important dans la capacité de colonisation des PSC (Figure 47).

4. Réintégration du développement embryonnaire et colonisation

Les PSC possèdent la capacité de s'auto-renouveler, c'est-à-dire de se multiplier indéfiniment dans un état de pluripotence stable sans accumuler de mutations dans leur génome. Lors de l'injection dans les embryons, les PSC doivent sortir de cet état d'auto-renouvellement pour intégrer le développement embryonnaire normal. *In vivo*, chez la souris et d'autres espèces de mammifères, les cellules du blastocyste peuvent suspendre leur croissance et entrer dans un état de dormance, appelé « diapause » (Murphy, 2020). Cet état de dormance est réversible et les cellules en diapause peuvent réintégrer le développement normal de l'embryon. Les cellules en diapause sont caractérisées par un ralentissement du cycle cellulaire et une diminution de la production de biomasse (Renfree and Fenelon, 2017). Bien que la diapause soit spécifique à l'embryon de souris, il est possible d'induire un état similaire chez l'homme (Iyer et al., 2023). Lors de l'analyse du transcriptome des chimères chimpanzé/lapin et souris/lapin, j'ai montré une augmentation globale des cellules en phase G1 du cycle cellulaire, suggérant un ralentissement du cycle, mais également une diminution globale de la traduction protéique et du métabolisme énergétique. Cette diminution pourrait indiquer une réduction des activités liées à la traduction et à la post-transcription, ce qui pourrait représenter une stratégie de réponse au stress ou d'adaptation environnementale pour les cellules PSC. Il est intéressant de noter que ces mécanismes sont similaires à ceux observés dans les cellules en dormance. De plus, l'activation de YAP, médiée par l'intégrine $\beta 1$, régule la réintégration des cellules en diapause dans le développement normal de l'embryon (Chen et al., 2024a). Par la suite, il serait intéressant d'étudier le transcriptome de cellules en diapause pour identifier les mécanismes partagés avec les PSC capables de coloniser, mécanismes potentiellement impliqués dans la réintégration des cellules au développement embryonnaire.

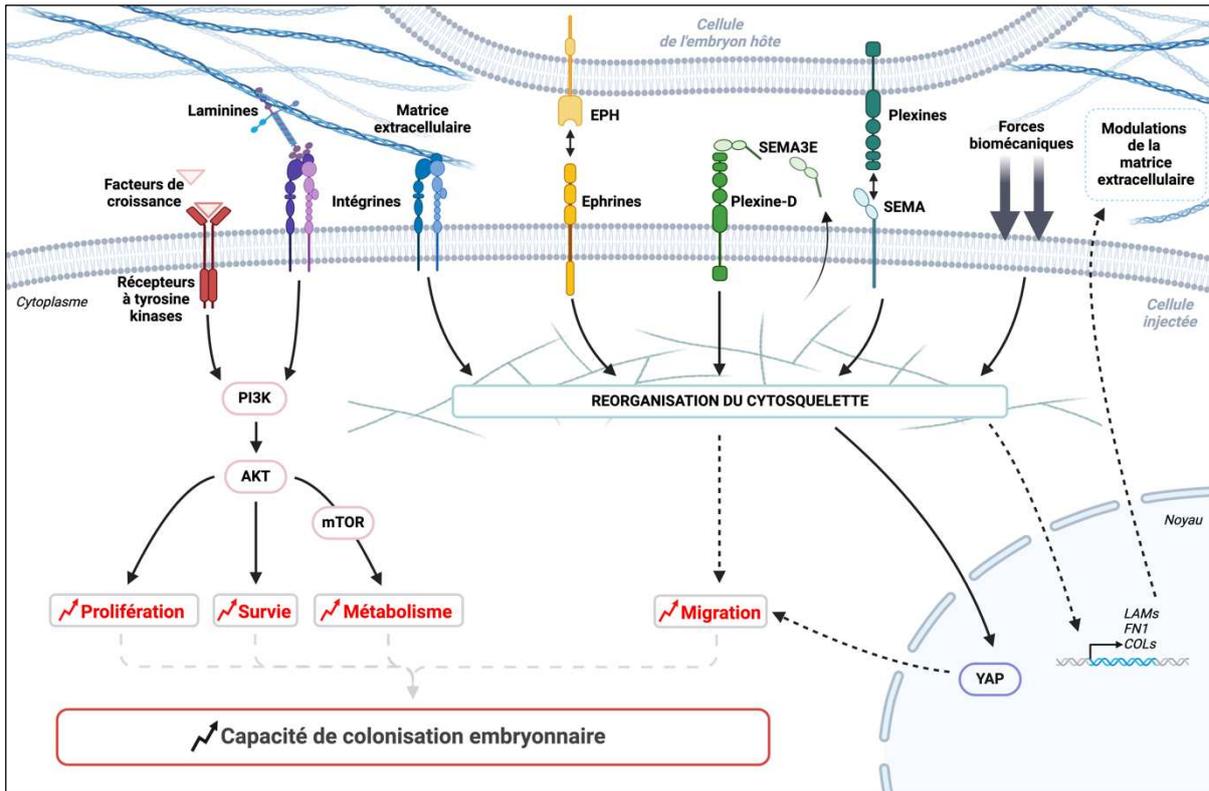


Figure 47 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la capacité de colonisation des PSC de lapin, de chimpanzé et de souris.

Schéma récapitulatif des mécanismes impliqués dans la capacité de colonisation de l'embryon de lapin par les PSC de lapin, de chimpanzé et de souris.

*

* *

Matériel et Méthodes

Lignées cellulaires et milieux de culture

PSC de lapin

Les lignées cellulaires de PSC de lapin B19 (Osteil et al., 2013) et KEP_KF sont cultivées à 38°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ et 5 % d'O₂, sur des fibroblastes embryonnaires de souris inactivés (Mouse Embryonic Fibroblasts ou MEF ; $1,6 \times 10^4$ MEF/cm²) par traitement à la mitomycine C (Sigma M4287). Leur milieu de culture, appelé KF, est composé de Dulbecco's Modified Eagle Medium : Mixture F-12 ou DMEM/F-12 (Gibco 21331-020), de 20 % de Knockout Serum Replacement (KOSR, Gibco 10828-028), de 1 % de solution d'acides aminés non essentiels 100X (Gibco 11140-035), de 1 % de solution de pénicilline-streptomycine-L-glutamine 100X (Gibco 10378-016), de 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco 11360-070), de 100 µM de 2-mercaptoéthanol (Gibco 31350-010), ainsi que de 10 ng/mL de FGF2 (Gibco PHG0263).

Les lignées cellulaires KEP_VAL sont cultivées à 38°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ et 5 % d'O₂ sur Matrigel (Corning 356231) dans un milieu de culture nommé VALGÖX (Tableau A). Ce milieu est composé de milieu N2B27 (Tableau B), pré-conditionné sur MEF (5×10^4 MEF/cm²), du 50 µg/mL d'Activine A, de 10 000 U/mL de Leukemia Inhibitory Factor (LIF), de 250 µM de vitamine C, de 2,5 µM de Gö6983, et de 2,5 µM de XAV939. Pour les lignées cellulaires KEPi_VAL+S, le Shield1 (Takara 632189) est ajouté au milieu de culture selon les concentrations indiquées (de 10 à 1000 nM).

Le milieu de culture de toutes les lignées est renouvelé quotidiennement. Tous les 2 à 3 jours, lors des passages, les cellules sont dissociées en cellules uniques par un traitement à la trypsine-EDTA à 0,05 % (Gibco 15400-054) pendant 5 minutes à 38°C.

Milieu (V)ALGÖX		
Produits	Références	[C] finale
N2B27 conditionné sur MEF	-	-
Activine A	Peptotech 120-14E	10 ng/mL
LIF	<i>Production au laboratoire</i>	10 000 U/mL
Gö6983	Bio-technie 2285	2,5 µM
XAV939	Sigma X3004-5MG	2,5 µM
(Vitamine C)	Sigma A8960	250 µM

Tableau A : Composition du milieu de culture VALGÖX

N2B27		
Produits	Références	[C] finale
Neurobasal medium	Gibco 21103-049	50%
DMEM-F12	Gibco 21331-020	50%
PSG	Gibco 10378-016	1%
β-mercaptoéthanol	Sigma 11061-68-0	100 µM
Supplément B27	Invitrogen 17504-044	1%
Supplément N2	<i>Production au laboratoire</i>	0,5%
FGF2 <i>(pour conditionnement sur MEF)</i>	Gibco PHG0263	20 ng/mL

N2 100X		
Produits	Références	[C] finale
Insulin	Sigma I6634-500MG	2,5 mg/mL
Human apo-transferrin	Sigma T1147-500MG	10 mg/mL
Progesterone	Sigma P8783-1G	0,00198 mg/mL
Putrescine dihydrochloride	Sigma P5780-5G	1,6 mg/mL
Sodium selenite	Sigma S5261-10G	0,00052 mg/mL
BSA Fraction V solution	Gibco 15260-037	5,025 mg/mL
DMEM-F12	Gibco 11320-074	-

Tableau B : Composition du milieu N2B27 et du supplément N2 (100X).

PSC de primates

Les lignées cellulaires de PSC humaines HEF36 et de PSC de chimpanzé Sandra A (Mora-Bermúdez et al., 2016), de macaque rhésus (Wianny et al., 2008) et de marmoset Cmes40 (Sasaki et al., 2005) sont cultivées à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ et 5 % d'O₂. Les PSC de chimpanzé et les PSC humaines sont cultivées sur Matrigel® (Corning 356231) dans le milieu commercial mTeSR™1 (StemCell Technologies 85850). En revanche, les PSC de macaque rhésus et de marmoset sont cultivées sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) dans un milieu de culture contenant du Knockout Dulbecco's Modified Eagle Medium (KO-DMEM, Gibco 10829-018), 20 % de Knockout Serum Replacement (KSR, Gibco 10828-028), 1 % de solution d'acides aminés non essentiels 100X (Gibco 11140-035), 1 % de solution de pénicilline-streptomycine-L-glutamine 100X (Gibco 10378-016), 100 µM de 2-mercaptoéthanol (Gibco 31350-010), ainsi que 4 à 8 ng/mL de FGF2 (Gibco PHG0263).

Les quatre lignées cellulaires, converties en conditions (V)ALGÖX, sont cultivées à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ et 5 % d'O₂, sur de la laminine 521 (5 µg/mL, Biolamina LN521), dans un milieu de culture (V)ALGÖX où l'ajout de vitamine C est transitoire (Tableau A). Le milieu de culture est renouvelé quotidiennement, et les cellules sont dissociées tous les 3 à 4 jours pour les passages par un traitement au TrypLE 1X (Gibco A12177-01) pendant 5 minutes à 37°C. Durant les 24 heures suivant les passages, 10 µM de Y27632 (Miltenyi 130-103-922) est ajouté au milieu.

PSC de souris

La lignée cellulaire d'ESC de souris E14tg2a est cultivée à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂, dans des boîtes tapissées de gélatine à 0,1 % (Sigma G1393). Le milieu de culture, appelé LIF/FCS, est composé de Glasgow's Minimum Essential Medium (GMEM, Gibco 21710-025), de 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco 10270-098, lot 4244096K ; Gibco A5256701, lot 2529135), de 1000 U/mL de LIF, de 1 % de solution d'acides aminés non essentiels 100X (Gibco 11140-035), de 1 % de solution de pénicilline-streptomycine-L-glutamine 100X (Gibco 10378-016), de 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco 11360-070), et de 10 µM de 2-mercaptoéthanol (Gibco 31350-010). Le milieu de culture est renouvelé quotidiennement, et les cellules sont dissociées tous les deux jours pour les passages, par traitement avec une solution de trypsine-EDTA à 0,25 % (Gibco 15400-054) pendant 5 minutes à 37°C.

Tri cellulaire des cellules CD75^{high}

Après dissociation, les cellules KEPI28_VAL+S ont été incubées pendant 15 minutes à température ambiante dans une solution contenant 10 % de sérum de veau fœtal, afin de bloquer les sites de liaison non spécifiques. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 30 minutes à température ambiante avec l'anticorps primaire ciblant la protéine membranaire CD75, dilué au 1/1000 (Abcam ab77676). Elles ont ensuite été incubées pendant 30 minutes supplémentaires à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué au 1/200 (Invitrogen A32728). Après plusieurs rinçages dans une solution de Phosphate-buffered saline (PBS, Gibco 14190169), la sous-population CD75^{high} a été triée à l'aide du trieur FACS Aria™ III (Becton Dickinson).

Production et culture d'embryons de lapin

La production d'embryons de lapin est réalisée par stimulation ovarienne de lapines sexuellement matures de la lignée néo-zélandaise blanche (Hypharm ; Charles River), via des injections intramusculaires d'hormones de stimulation folliculaire et lutéinisante (Stimufol® Reprobiol), suivie d'une insémination artificielle ou d'un accouplement naturel avec des mâles sexuellement matures, conformément au protocole de Teixeira et al. (Teixeira et al., 2018). Les embryons au stade 8 cellules (E1.5) sont prélevés dans l'oviducte 36 à 40 heures après l'insémination ou l'accouplement. Ensuite, les embryons sont cultivés à 38°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂, dans un milieu appelé RDH, composé d'un mélange 1:1:1 de DMEM (Gibco 31966-021), RPMI 1640 (Gibco 61870-010) et Ham's F10 (Gibco 41550-021), complété par 3 mg/mL de BSA (Sigma A3311) et 0,65 mg/mL de taurine (Sigma T8691).

Microinjections

Huit à 10 PSC de lapin sont microinjectées sous la zone pellucide des morulas de lapin (E2.5). Pendant les 24 heures suivant l'injection, elles sont cultivées dans un mélange 1:1 des milieux de culture des cellules injectées et RDH. Après cette période, tous les embryons sont traités avec une solution de Pronase à 5 mg/mL (Sigma P8811) pour retirer la zone pellucide et le manteau muqueux des embryons. La culture des embryons se poursuit alors exclusivement dans le milieu RDH.

Cinq à 8 PSC de primates sont microinjectées sous la zone pellucide des morulas de lapin (E2.5). Pendant les 4 heures suivant la microinjection des PSC de primates ou de souris, les embryons sont cultivés dans 100 % du milieu de culture des cellules injectées ((V)ALGÖX ou LIF/FCS). Ensuite, pour les 20 heures suivantes, ils sont transférés dans un mélange 1:1 de milieu de culture des cellules injectées et de milieu RDH. Après 24 heures de culture, la zone pellucide et le manteau muqueux des embryons sont retirés grâce à un traitement à la Pronase à 5 mg/mL (Sigma P8811). Suite à cela, la culture des embryons se poursuit exclusivement dans le milieu RDH.

Immunofluorescences

Immunomarquages sur cellules

Les cellules ont été fixées dans une solution de Phosphate-buffered saline (PBS ; Gibco 14040133) contenant du paraformaldéhyde (PFA ; Thermo Fisher 17948900) à 2 % à température ambiante pendant 20 minutes. Ensuite, les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS avant d'être perméabilisées dans du PBS contenant 0,5 % de Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich X100). Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués à l'aide d'une solution de PBS et de 10 % de sérum d'âne (Sigma-Aldrich D9663) pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules ont été incubées pendant une nuit à 4 °C avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage ([Tableau C](#)). Après trois rinçages au PBS, les cellules ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaires ([Tableau D](#)). Les noyaux ont été marqués avec 0,5 µg/mL de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI ; Invitrogen D1306). Les cellules ont été montées sur des lames à l'aide du milieu de montage M1289 (Sigma). Enfin, les cellules ont été analysées au microscope confocal (Leica DM600 CS SP5), et les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un objectif à immersion à huile (Leica 45x/1.25 0.75, PL APO HCX).

Immunomarquages sur embryons

Les embryons pré-implantatoires ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4 % pendant 20 minutes à température ambiante (Thermo Fisher 17948900). Après trois rinçages dans du PBS (Gibco 14190169), les embryons ont été perméabilisés pendant 15 minutes dans une solution de PBS contenant 0,5 % de Triton™ 100X (Sigma-Aldrich X100). Ils ont ensuite été transférés dans une solution de blocage composée de 2 % d'albumine de sérum bovin (BSA ; Sigma-Aldrich A3311) diluée dans du PBS. Puis, les embryons ont été

incubés pendant une nuit à +4 °C sous agitation dans une solution d'anticorps primaires dilués dans la solution de blocage (Tableau C). Après deux rinçages au PBS, les embryons ont été incubés pendant 1 heure à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaires dilués à 1/500 dans la solution de blocage (Tableau D). Après plusieurs rinçages au PBS, l'ADN a été marqué grâce à un bain de DAPI à 0,5 µg/mL (Invitrogen D1306) pendant 10 minutes à température ambiante. Les embryons ont été analysés au microscope confocal (Leica DM600 CS SP5), et les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un objectif à immersion à eau (Leica 25×/1.25 0.75, PL APO HCX).

Cible	Références	Source	Dilution
ALPPL2	Abcam ab96497	Lapin	1:100
DPPA5	R&D Systems AF3125	Chèvre	1:100
FLAG	Invitrogen MA1-91878	Souris	1:200
GFP	Invitrogen A10262	Poulet	1:200
HA	H6908 Sigma	Lapin	1:200
H3K9me3	Abcam ab8898	Lapin	1:400
H3K14Ac	Abcam ab52946	Lapin	1:400
H3R2me2/3	Abcam ab175007	Lapin	1:400
huN	Sigma MAB1281	Souris	1:100
KLF17	Sigma HPA 024629	Lapin	1:100
NANOG	R&D Systems AF1997	Chèvre	1:100
OCT4	Santa Cruz Biotech. sc-9081	Lapin	1:100
SOX2	R&D Systems AF2018	Chèvre	1:100
TFAP2C	R&D Systems AF5059	Chèvre	1:200
TFCP2L1	R&D Systems AF5726	Chèvre	1:100
V5	Invitrogen R96025	Souris	1:100
5mC	EMD Millipore MABE146	Souris	1:400

Tableau C : Anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages.

Cible	Excitation/Emission	Références	Source	Dilution
Poulet	495/519nm	Abcam ab63507	Âne	1:500
Souris	558/572nm	Invitrogen A32773	Âne	1:500
	650/671nm	Invitrogen A31571	Âne	1:500
Chèvre	499/520nm	Invitrogen A11055	Âne	1:500
	553/568nm	Invitrogen A21432	Âne	1:500
	650/671nm	Invitrogen A21447	Âne	1:500
Lapin	553/568nm	Invitrogen A31572	Âne	1:500
	650/671nm	Invitrogen A31573	Âne	1:500

Tableau D : Anticorps secondaires utilisés pour les immunomarquages.

Western Blot

Les cellules ont été lysées pendant 4 heures à 4 °C dans un tampon de lyse RIPA (0,5 % NP-40, 1 % Triton 100X, 10 % glycérol, 20 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 0,1 % DTT) et un inhibiteur de protéases (Roche 05892970001). La concentration en protéines des échantillons a été évaluée à l'aide du test de Bradford. Pour l'électrophorèse SDS-PAGE, 30 µg de protéines totales et un marqueur de poids moléculaire (BioRad 1610374) ont été chargés par puits dans des gels Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast à 10 % (BioRad 4568031). Après électrophorèse, les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose à l'aide du kit de transfert Trans-Blot® Turbo™ RTA Midi (BioRad 1704271). Les membranes ont ensuite été bloquées pendant 1 heure à température ambiante dans une solution TBST (200 mM Tris-HCl, 1,5 M NaCl, 0,1 % Tween-20) contenant 5 % de lait. Ensuite, les membranes ont été incubées pendant une nuit à 4 °C avec des anticorps primaires anti-AKT (Cell Signaling 4691) et phospho-AKT (Ser473 : Cell Signaling 4060 ; Thr308 : Cell Signaling 4056) dilués à 1/1000. Puis, les membranes ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante avec les anticorps secondaires (Jackson ImmunoResearch 211-032-171) dilués à 1/5000. Les membranes ont également été incubées pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps anti-bêta-actine conjugué à la peroxydase (Sigma-

Aldrich A3854) dilué à 1/10 000. Les membranes ont été révélées grâce au substrat Clarity™ Western ECL (BioRad 170-5060) et au système d'imagerie ChemiDoc™ MP (BioRad).

Séquençages ARN

Séquençage ARN des PSC de lapin

Les ARN totaux ont été isolés à l'aide de Trizol/chloroforme, suivi du RNeasy Mini Kit (Qiagen 74106) associé à un traitement à la DNase I (Qiagen 79254). Trois nanogrammes d'ARN totaux ont été utilisés pour l'amplification avec le kit SMART-Seq V4 Ultra Low Input RNA (Clontech), conformément aux recommandations du fabricant (10 cycles de PCR ont été effectués). La qualité de l'ADNc a été évaluée sur un Agilent Bioanalyzer 2100, en utilisant un kit Agilent High Sensitivity DNA. Des *librairies* ont été préparées à partir de 0,15 ng d'ADNc à l'aide du kit Nextera XT Illumina Library Preparation. Les *librairies* ont été regroupées en proportions équimolaires et séquencées (Paired-end 50-34 bp) sur un instrument Illumina NextSeq500, à l'aide d'un kit NextSeq 500 High Output de 75 cycles. Le démultiplexage a été réalisé avec bcl2fastq2 (version 2.18.12), et les adaptateurs ont été coupés avec Cutadapt (versions 1.15 et 3.2) afin de ne conserver que les *reads* de plus de 10 bp. Le nombre de reads obtenus était compris entre 10 et 200 millions. Ils ont ensuite été alignés sur le génome du lapin (OryCun2_ensembl92) avec Tophat2. Les matrices de comptage ont été générées à l'aide de FeatureCounts (version 1.5.0-p2). Chaque échantillon a été analysé en trois réplicats biologiques.

Séquençage ARN des PSC de primates

Les ARN totaux ont été extraits de 4 à 5 × 10⁶ cellules grâce au RNeasy Mini Kit (Qiagen 74106). Les échantillons ont été séquencés avec le séquenceur NovaSeq (Illumina) en *reads* uniques de 101 bp. Le démultiplexage a été réalisé avec bcl2fastq2, et le découpage des adaptateurs a été effectué avec Cutadapt. Grâce à HISAT2, les *reads* ont été alignés sur le génome humain (GRCh38.p13 – Ensembl Release 108), de chimpanzé (Ensembl Pan_tro_3.0 Release 109), de macaque rhésus (Ensembl Mmul_10 Release 109) ou de marmoset (mCalJac1.pat.X Release 109), en fonction des échantillons. Chaque échantillon a été analysé en triplicats biologiques.

Séquençage ARN des embryons chimères

Deux jours après la microinjection, les blastocystes chimériques ont été disséqués à l'aide d'une pipette à bouche et de capillaires en verre effilés (Hirschmann™ 9600150). Les embryons disséqués ont ensuite été incubés pendant 3 à 4 minutes à 37 °C dans une goutte de solution à 0,25 % de Trypsine-EDTA (Gibco 15400-054). Après incubation, les embryons ont été dissociés mécaniquement en cellules uniques dans une goutte de Polyvinyl alcool à 0,01% (Sigma P8136). Les cellules uniques GFP- et GFP+ ont été triées et isolées dans les puits d'une puce de séquençage CellenCHIP® (Cellenion) à l'aide de l'instrument cellenONE® X1 (Cellenion). Les puces ont ensuite été séquencées avec le séquenceur NextSeq 2000 (Illumina), avec une profondeur d'environ 10 millions de *reads*. Le démultiplexage a été réalisé avec Dragen BCLconvert. L'alignement des *reads* sur les génomes de chimpanzé (Ensembl Pan_tro_3.0 Release 109), de souris (GRCm39 – Ensembl Release 108) et de lapin (OryCun2_ensembl92), ainsi que la génération des matrices de comptage, ont été effectués avec STARsolo.

Analyses bioinformatiques

Transcriptome des PSC

Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel R (version 4.1.2). La normalisation des données, les niveaux d'expression des gènes et les analyses en composantes principales (PCA) ont été réalisées avec le package DESeq2 (version 1.34.0) (Love et al., 2014). Pour chaque échantillon, les niveaux d'expression moyens des gènes et les écarts-types ont été calculés en utilisant les fonctions de base du logiciel R (version 4.1.2). Après transformation en log₂, les comptages normalisés ont servi à produire des *heatmaps* avec le package pheatmap (version 1.9.12). DESeq2 a calculé le *Fold Change* (FC) transformé en log₂ ainsi que les p-values pour chaque gène entre deux conditions. Les gènes différentiellement exprimés (DEG) ont été identifiés en utilisant les résultats de DESeq2 et les seuils suivants : FC > 2 U FC < -2, p-value < 0,05. Les diagrammes de Venn ont été réalisés avec le package VennDiagram (version 1.7.3), et les *Volcano plots* ont été conçus avec le package ggplot2 (version 3.4.1). Enfin, l'analyse de l'enrichissement des voies KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) a été réalisée à l'aide de l'outil en ligne EnrichR (Chen et al., 2013) et de la base de données des voies KEGG humaines (version 2021).

Transcriptome des embryons en cellule unique

Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel R (version 4.1.2). Le nettoyage, la normalisation, les réductions de dimension (PCA et UMAP), ainsi que le partitionnement et la visualisation des données ont été réalisés avec le package Seurat (version 4.3.0). Les gènes différentiellement exprimés (DEG) ont été identifiés grâce à Seurat en utilisant les seuils suivants : $\log_2FC = 0,35$; $mean.pct = 0,5$; $p\text{-value} < 0,05$. Les *Volcano plots* ont été réalisés à l'aide du package ggplot2 (version 3.4.1). Les analyses d'enrichissement KEGG et GO ont été effectuées avec la version 4.3.1 du logiciel R et les packages ClusterProfiler (version 4.10.2), DOSE (version 3.28.2), org.Hs.eg.db (version 3.18.0) et org.Mm.eg.db (version 3.18.0).

Disponibilité des données

Les données transcriptomiques relatives aux cellules B19, KEPc et KEPi ont été déposées sur GEO (GSE250288) et seront accessibles au public à la date de publication. En ce qui concerne les données de séquençage ARN des PSC de primates et des embryons chimériques, celles-ci seront déposées sur GEO avant la soumission des articles à l'éditeur.

Statistiques

Le test U de Mann-Whitney, adapté aux distributions non normales, et le t-test, applicable aux distributions suivant une loi normale, ont été réalisés à l'aide du logiciel R (version 4.1.2) pour comparer les moyennes entre les échantillons. Une différence a été considérée comme significative si la p-value associée à la différence entre les moyennes était inférieure à 0,05.

*

* *

Références bibliographiques

- Acampora, D., L.G. Di Giovannantonio, and A. Simeone. 2013. Otx2 is an intrinsic determinant of the embryonic stem cell state and is required for transition to a stable epiblast stem cell condition. *Development*. 140:43–55. doi:10.1242/dev.085290.
- Afanassieff, M., P. Osteil, and P. Savatier. 2015. Generation of Embryonic Stem Cells in Rabbits. In *Embryonic Stem Cell Protocols*. K. Turksen, editor. Springer New York, New York, NY. 49–66.
- Afanassieff, M., F. Perold, W. Bouchereau, A. Cadiou, and N. Beaujean. 2020. Embryo-derived and induced pluripotent stem cells: Towards naive pluripotency and chimeric competency in rabbits. *Experimental Cell Research*. 389:111908. doi:10.1016/j.yexcr.2020.111908.
- Aksoy, I., V. Giudice, E. Delahaye, F. Wianny, M. Aubry, M. Mure, J. Chen, R. Jauch, G.K. Bogu, T. Nolden, H. Himmelbauer, M. Xavier Doss, A. Sachinidis, H. Schulz, O. Hummel, P. Martinelli, N. Hübner, L.W. Stanton, F.X. Real, P.-Y. Bourillot, and P. Savatier. 2014. Klf4 and Klf5 differentially inhibit mesoderm and endoderm differentiation in embryonic stem cells. *Nat Commun*. 5:3719. doi:10.1038/ncomms4719.
- Aksoy, I., C. Rognard, A. Moulin, G. Marcy, E. Masfaraud, F. Wianny, V. Cortay, A. Bellemin-Ménard, N. Doerflinger, M. Dirheimer, C. Mayère, P.-Y. Bourillot, C. Lynch, O. Raineteau, T. Joly, C. Dehay, M. Serrano, M. Afanassieff, and P. Savatier. 2021. Apoptosis, G1 Phase Stall, and Premature Differentiation Account for Low Chimeric Competence of Human and Rhesus Monkey Naive Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 16:56–74. doi:10.1016/j.stemcr.2020.12.004.
- Aladjem, M.I., B.T. Spike, L.W. Rodewald, T.J. Hope, M. Klemm, R. Jaenisch, and G.M. Wahl. 1998. ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Current Biology*. 8:145–155. doi:10.1016/S0960-9822(98)70061-2.
- Alexandrova, S., T. Kalkan, P. Humphreys, A. Riddell, R. Scognamiglio, A. Trumpp, and J. Nichols. 2015. Selection and dynamics of embryonic stem cell integration into early mouse embryos. *Development*. dev.124602. doi:10.1242/dev.124602.
- Amoyel, M., and E.A. Bach. 2014. Cell competition: how to eliminate your neighbours. *Development*. 141:988–1000. doi:10.1242/dev.079129.

- Anwised, P., R. Moorawong, W. Samruan, S. Somredngan, J. Srisutush, C. Laowtammathron, I. Aksoy, R. Parnpai, and P. Savatier. 2023. An expedition in the jungle of pluripotent stem cells of non-human primates. *Stem Cell Reports*. S2213671123003727. doi:10.1016/j.stemcr.2023.09.013.
- Argelaguet, R., S.J. Clark, H. Mohammed, L.C. Stapel, C. Krueger, C.-A. Kapourani, I. Imaz-Rosshandler, T. Lohoff, Y. Xiang, C.W. Hanna, S. Smallwood, X. Ibarra-Soria, F. Buettner, G. Sanguinetti, W. Xie, F. Krueger, B. Göttgens, P.J. Rugg-Gunn, G. Kelsey, W. Dean, J. Nichols, O. Stegle, J.C. Marioni, and W. Reik. 2019. Multi-omics profiling of mouse gastrulation at single-cell resolution. *Nature*. 576:487–491. doi:10.1038/s41586-019-1825-8.
- Arman, E., R. Haffner-Krausz, Y. Chen, J.K. Heath, and P. Lonai. 1998. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:5082–5087. doi:10.1073/pnas.95.9.5082.
- Arora, S., A.M. Scott, and P.W. Janes. 2023. Eph Receptors in Cancer. *Biomedicines*. 11:315. doi:10.3390/biomedicines11020315.
- Arvanitis, D., and A. Davy. 2008. Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev*. 22:416–429. doi:10.1101/gad.1630408.
- Augui, S., E.P. Nora, and E. Heard. 2011. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nat Rev Genet*. 12:429–442. doi:10.1038/nrg2987.
- Avilion, A.A., S.K. Nicolis, L.H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, and R. Lovell-Badge. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 17:126–140. doi:10.1101/gad.224503.
- Avner, P., and E. Heard. 2001. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet*. 2:59–67. doi:10.1038/35047580.
- Babinet, C., and G.R. Bordenave. 1980. Chimaeric rabbits from immunosurgically-prepared inner-cell-mass transplantation. *J Embryol Exp Morphol*. 60:429–440.
- Baker, N.E. 2017. Mechanisms of cell competition emerging from Drosophila studies. *Current Opinion in Cell Biology*. 48:40–46. doi:10.1016/j.ceb.2017.05.002.
- Banaszynski, L.A., L. Chen, L.A. Maynard-Smith, A.G.L. Ooi, and T.J. Wandless. 2006. A Rapid, Reversible, and Tunable Method to Regulate Protein Function in Living Cells Using Synthetic Small Molecules. *Cell*. 126:995–1004. doi:10.1016/j.cell.2006.07.025.

- Bao, S., W.W. Tang, B. Wu, S. Kim, J. Li, L. Li, T. Kobayashi, C. Lee, Y. Chen, M. Wei, S. Li, S. Dietmann, F. Tang, X. Li, and M.A. Surani. 2018. Derivation of hypermethylated pluripotent embryonic stem cells with high potency. *Cell Res.* 28:22–34. doi:10.1038/cr.2017.134.
- Bardot, E.S., and A.-K. Hadjantonakis. 2020. Mouse gastrulation: Coordination of tissue patterning, specification and diversification of cell fate. *Mechanisms of Development.* 163:103617. doi:10.1016/j.mod.2020.103617.
- Bayerl, J., M. Ayyash, T. Shani, Y.S. Manor, O. Gafni, R. Massarwa, Y. Kalma, A. Aguilera-Castrejon, M. Zerbib, H. Amir, D. Sheban, S. Geula, N. Mor, L. Weinberger, S. Naveh Tassa, V. Krupalnik, B. Oldak, N. Livnat, S. Tarazi, S. Tawil, E. Wildschutz, S. Ashouokhi, L. Lasman, V. Rotter, S. Hanna, D. Ben-Yosef, N. Novershtern, S. Viukov, and J.H. Hanna. 2021. Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction. *Cell Stem Cell.* 28:1549-1565.e12. doi:10.1016/j.stem.2021.04.001.
- Beddington, R.S.P., and E.J. Robertson. 1989. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development.* 105:733–737. doi:10.1242/dev.105.4.733.
- Bedzhov, I., and M. Zernicka-Goetz. 2014. Self-Organizing Properties of Mouse Pluripotent Cells Initiate Morphogenesis upon Implantation. *Cell.* 156:1032–1044. doi:10.1016/j.cell.2014.01.023.
- Bergert, M., S. Lembo, S. Sharma, L. Russo, D. Milovanović, K.H. Gretarsson, M. Börmel, P.A. Neveu, J.A. Hackett, E. Petsalaki, and A. Diz-Muñoz. 2021. Cell Surface Mechanics Gate Embryonic Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell.* 28:209-216.e4. doi:10.1016/j.stem.2020.10.017.
- Bianchi-Smiraglia, A., S. Paesante, and A.V. Bakin. 2013. Integrin $\beta 5$ contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells through the Src-FAK and MEK-ERK signaling pathways. *Oncogene.* 32:3049–3058. doi:10.1038/onc.2012.320.
- Blakeley, P., N.M.E. Fogarty, I. Del Valle, S.E. Wamaitha, T.X. Hu, K. Elder, P. Snell, L. Christie, P. Robson, and K.K. Niakan. 2015. Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Development.* dev.123547. doi:10.1242/dev.123547.
- Blaschke, K., K.T. Ebata, M.M. Karimi, J.A. Zepeda-Martínez, P. Goyal, S. Mahapatra, A. Tam, D.J. Laird, M. Hirst, A. Rao, M.C. Lorincz, and M. Ramalho-Santos. 2013. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature.* 500:222–226. doi:10.1038/nature12362.

- Bodó, S., E. Gócza, T. Révay, L. Hiripi, B. Carstea, A. Kovács, L. Bodrogi, and Z. Bösze. 2004. Production of transgenic chimeric rabbits and transmission of the transgene through the germline. *Molecular Reproduction Devel.* 68:435–440. doi:10.1002/mrd.20109.
- Boeuf, H., C. Hauss, F.D. Graeve, N. Baran, and C. Keding. 1997. Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 138:1207–1217. doi:10.1083/jcb.138.6.1207.
- Boroviak, T., R. Loos, P. Bertone, A. Smith, and J. Nichols. 2014. The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat Cell Biol.* 16:513–525. doi:10.1038/ncb2965.
- Boroviak, T., R. Loos, P. Lombard, J. Okahara, R. Behr, E. Sasaki, J. Nichols, A. Smith, and P. Bertone. 2015. Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. *Developmental Cell.* 35:366–382. doi:10.1016/j.devcel.2015.10.011.
- Boroviak, T., and J. Nichols. 2017. Primate embryogenesis predicts the hallmarks of human naïve pluripotency. *Development.* 144:175–186. doi:10.1242/dev.145177.
- Bouchereau, W., L. Jouneau, C. Archilla, I. Aksoy, A. Moulin, N. Daniel, N. Peynot, S. Calderari, T. Joly, M. Godet, Y. Jaszczyszyn, M. Pratlong, D. Severac, P. Savatier, V. Duranthon, M. Afanassieff, and N. Beaujean. 2022. Major transcriptomic, epigenetic and metabolic changes underlie the pluripotency continuum in rabbit preimplantation embryos. *Development.* 149:dev200538. doi:10.1242/dev.200538.
- Bourillot, P.-Y., I. Aksoy, V. Schreiber, F. Wianny, H. Schulz, O. Hummel, N. Hubner, and P. Savatier. 2009. Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells.* 27:1760–1771. doi:10.1002/stem.110.
- Bourillot, P.-Y., C. Santamaria, L. David, and P. Savatier. 2020. GP130 signaling and the control of naïve pluripotency in humans, monkeys, and pigs. *Experimental Cell Research.* 386:111712. doi:10.1016/j.yexcr.2019.111712.
- Boward, B., T. Wu, and S. Dalton. 2016. Concise Review: Control of Cell Fate Through Cell Cycle and Pluripotency Networks. *Stem Cells.* 34:1427–1436. doi:10.1002/stem.2345.
- Bowling, S., A. Di Gregorio, M. Sancho, S. Pozzi, M. Aarts, M. Signore, M. D. Schneider, J.P. Martinez-Barbera, J. Gil, and T.A. Rodríguez. 2018. P53 and mTOR signalling determine fitness selection through cell competition during early mouse embryonic development. *Nat Commun.* 9:1763. doi:10.1038/s41467-018-04167-y.

- Bredenkamp, N., G.G. Stirparo, J. Nichols, A. Smith, and G. Guo. 2019a. The Cell-Surface Marker Sushi Containing Domain 2 Facilitates Establishment of Human Naive Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 12:1212–1222. doi:10.1016/j.stemcr.2019.03.014.
- Bredenkamp, N., J. Yang, J. Clarke, G.G. Stirparo, F. Von Meyenn, S. Dietmann, D. Baker, R. Drummond, Y. Ren, D. Li, C. Wu, M. Rostovskaya, S. Eminli-Meissner, A. Smith, and G. Guo. 2019b. Wnt Inhibition Facilitates RNA-Mediated Reprogramming of Human Somatic Cells to Naive Pluripotency. *Stem Cell Reports*. 13:1083–1098. doi:10.1016/j.stemcr.2019.10.009.
- Briggs, S.F., A.A. Dominguez, S.L. Chavez, and R.A. Reijo Pera. 2015. Single-Cell XIST Expression in Human Preimplantation Embryos and Newly Reprogrammed Female Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells*. 33:1771–1781. doi:10.1002/stem.1992.
- Brons, I.G.M., L.E. Smithers, M.W.B. Trotter, P. Rugg-Gunn, B. Sun, S.M. Chuva de Sousa Lopes, S.K. Howlett, A. Clarkson, L. Ahrlund-Richter, R.A. Pedersen, and L. Vallier. 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*. 448:191–195. doi:10.1038/nature05950.
- Buecker, C., R. Srinivasan, Z. Wu, E. Calo, D. Acampora, T. Faial, A. Simeone, M. Tan, T. Swigut, and J. Wysocka. 2014. Reorganization of Enhancer Patterns in Transition from Naive to Primed Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 14:838–853. doi:10.1016/j.stem.2014.04.003.
- Burdon, T., C. Stracey, I. Chambers, J. Nichols, and A. Smith. 1999. Suppression of SHP-2 and ERK Signalling Promotes Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells. *Developmental Biology*. 210:30–43. doi:10.1006/dbio.1999.9265.
- Cao, J., W. Li, J. Li, Md.A. Mazid, C. Li, Y. Jiang, W. Jia, L. Wu, Z. Liao, S. Sun, W. Song, J. Fu, Y. Wang, Y. Lu, Y. Xu, Y. Nie, X. Bian, C. Gao, X. Zhang, L. Zhang, S. Shang, Y. Li, L. Fu, H. Liu, J. Lai, Y. Wang, Y. Yuan, X. Jin, Y. Li, C. Liu, Y. Lai, X. Shi, P.H. Maxwell, X. Xu, L. Liu, M. Poo, X. Wang, Q. Sun, M.A. Esteban, and Z. Liu. 2023. Live birth of chimeric monkey with high contribution from embryonic stem cells. *Cell*. 186:4996-5014.e24. doi:10.1016/j.cell.2023.10.005.
- Casazza, A., V. Finisguerra, L. Capparuccia, A. Camperi, J.M. Swiercz, S. Rizzolio, C. Rolny, C. Christensen, A. Bertotti, I. Sarotto, M. Risio, L. Trusolino, J. Weitz, M. Schneider, M. Mazzone, P.M. Comoglio, and L. Tamagnone. 2010. Sema3E–Plexin D1 signaling drives human cancer cell invasiveness and metastatic spreading in mice. *J. Clin. Invest.* 120:2684–2698. doi:10.1172/JCI42118.

- Cauffman, G., M. De Rycke, K. Sermon, I. Liebaers, and H. Van De Velde. 2009. Markers that define stemness in ESC are unable to identify the totipotent cells in human preimplantation embryos. *Human Reproduction*. 24:63–70. doi:10.1093/humrep/den351.
- Chambers, I., D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, and A. Smith. 2003. Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell*. 113:643–655. doi:10.1016/S0092-8674(03)00392-1.
- Chang, T.-C., Y.-G. Liu, C.A. Eddy, E.S. Jacoby, P.A. Binkley, R.G. Brzyski, and R.S. Schenken. 2011. Derivation and Characterization of Novel Nonhuman Primate Embryonic Stem Cell Lines from In Vitro-Fertilized Baboon Preimplantation Embryos. *Stem Cells and Development*. 20:1053–1062. doi:10.1089/scd.2010.0372.
- Chazaud, C., Y. Yamanaka, T. Pawson, and J. Rossant. 2006. Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Developmental Cell*. 10:615–624. doi:10.1016/j.devcel.2006.02.020.
- Chen, E.Y., C.M. Tan, Y. Kou, Q. Duan, Z. Wang, G.V. Meirelles, N.R. Clark, and A. Ma'ayan. 2013. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 14:128. doi:10.1186/1471-2105-14-128.
- Chen, H., I. Aksoy, F. Gonnot, P. Osteil, M. Aubry, C. Hamela, C. Rognard, A. Hochard, S. Voisin, E. Fontaine, M. Mure, M. Afanassieff, E. Cleroux, S. Guibert, J. Chen, C. Vallot, H. Acloque, C. Genthon, C. Donnadiou, J. De Vos, D. Sanlaville, J.-F. Guérin, M. Weber, L.W. Stanton, C. Rougeulle, B. Pain, P.-Y. Bourillot, and P. Savatier. 2015a. Reinforcement of STAT3 activity reprogrammes human embryonic stem cells to naive-like pluripotency. *Nat Commun*. 6:7095. doi:10.1038/ncomms8095.
- Chen, R., R. Fan, F. Chen, N. Govindasamy, H. Brinkmann, M. Stehling, R.H. Adams, H.-W. Jeong, and I. Bedzhov. 2024a. Analyzing embryo dormancy at single-cell resolution reveals dynamic transcriptional responses and activation of integrin-Yap/Taz prosurvival signaling. *Cell Stem Cell*. S1934590924002509. doi:10.1016/j.stem.2024.06.015.
- Chen, W., H. Yang, L. Huang, C. Fang, L. Yao, F. Liu, and T. Jin. 2024b. ROS-mediated ITGB5 promotes tongue squamous cell carcinoma metastasis through epithelial mesenchymal transition and cell adhesion signal pathway. *J Cancer Res Clin Oncol*. 150:398. doi:10.1007/s00432-024-05922-z.
- Chen, Y., Y. Niu, Y. Li, Z. Ai, Y. Kang, H. Shi, Z. Xiang, Z. Yang, T. Tan, W. Si, W. Li, X. Xia, Q. Zhou, W. Ji, and T. Li. 2015b. Generation of Cynomolgus Monkey Chimeric Fetuses using Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 17:116–124. doi:10.1016/j.stem.2015.06.004.

- Chen, Y.-L., Y.-C. Yen, C.-W. Jang, S.-H. Wang, H.-T. Huang, C.-H. Chen, J.-R. Hsiao, J.-Y. Chang, and Y.-W. Chen. 2021. Ephrin A4-ephrin receptor A10 signaling promotes cell migration and spheroid formation by upregulating NANOG expression in oral squamous cell carcinoma cells. *Sci Rep.* 11:644. doi:10.1038/s41598-020-80060-3.
- Chew, J.-L., Y.-H. Loh, W. Zhang, X. Chen, W.-L. Tam, L.-S. Yeap, P. Li, Y.-S. Ang, B. Lim, P. Robson, and H.-H. Ng. 2005. Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol.* 25:6031–6046. doi:10.1128/MCB.25.14.6031-6046.2005.
- Christians, E., V.H. Rao, and J.P. Renard. 1994. Sequential Acquisition of Transcriptional Control during Early Embryonic Development in the Rabbit. *Developmental Biology.* 164:160–172. doi:10.1006/dbio.1994.1188.
- Clevers, H. 2006. Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell.* 127:469–480. doi:10.1016/j.cell.2006.10.018.
- Cole, M.F., S.E. Johnstone, J.J. Newman, M.H. Kagey, and R.A. Young. 2008. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev.* 22:746–755. doi:10.1101/gad.1642408.
- Coronado, D., M. Godet, P.-Y. Bourillot, Y. Tapponnier, A. Bernat, M. Petit, M. Afanassieff, S. Markossian, A. Malashicheva, R. Iacone, K. Anastasiadis, and P. Savatier. 2013. A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Research.* 10:118–131. doi:10.1016/j.scr.2012.10.004.
- Dahéron, L., S.L. Opitz, H. Zaehres, W.M. Lensch, P.W. Andrews, J. Itskovitz-Eldor, and G.Q. Daley. 2004. LIF/STAT3 Signaling Fails to Maintain Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS.* 22:770–778. doi:10.1634/stemcells.22-5-770.
- Das, T.P., D.A. Kipp, D.S. Kliman, S.S. Patil, D.J. Curtis, M.E. O'Brien, M.I. Swain, J.M.L. Widjaja, J.L. Cooke, M.N. Ziino, and A. Spencer. 2021. Important factors in implementation of lineage-specific chimerism analysis for routine use. *Bone Marrow Transplant.* 56:946–948. doi:10.1038/s41409-020-01089-6.
- Dattani, A., E. Corujo-Simon, A. Radley, T. Heydari, Y. Taheriabkenar, F. Carlisle, S. Lin, C. Liddle, J. Mill, P.W. Zandstra, J. Nichols, and G. Guo. 2024. Naive pluripotent stem cell-based models capture FGF-dependent human hypoblast lineage specification. *Cell Stem Cell.* S1934590924001802. doi:10.1016/j.stem.2024.05.003.
- Dattani, A., T. Huang, C. Liddle, A. Smith, and G. Guo. 2022. Suppression of YAP safeguards human naïve pluripotency. *Development.* dev.200988. doi:10.1242/dev.200988.

- De Belly, H., A. Stubb, A. Yanagida, C. Labouesse, P.H. Jones, E.K. Paluch, and K.J. Chalut. 2021. Membrane Tension Gates ERK-Mediated Regulation of Pluripotent Cell Fate. *Cell Stem Cell*. 28:273–284.e6. doi:10.1016/j.stem.2020.10.018.
- Dietrich, J.-E., and T. Hiiragi. 2007. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development*. 134:4219–4231. doi:10.1242/dev.003798.
- Dupont, S., L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giulitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato, S. Bicciato, N. Elvassore, and S. Piccolo. 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*. 474:179–183. doi:10.1038/nature10137.
- Esteban, M.A., T. Wang, B. Qin, J. Yang, D. Qin, J. Cai, W. Li, Z. Weng, J. Chen, S. Ni, K. Chen, Y. Li, X. Liu, J. Xu, S. Zhang, F. Li, W. He, K. Labuda, Y. Song, A. Peterbauer, S. Wolbank, H. Redl, M. Zhong, D. Cai, L. Zeng, and D. Pei. 2010. Vitamin C Enhances the Generation of Mouse and Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 6:71–79. doi:10.1016/j.stem.2009.12.001.
- Evans, M.J., and M.H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292:154–156. doi:10.1038/292154a0.
- Factor, D.C., O. Corradin, G.E. Zentner, A. Saiakhova, L. Song, J.G. Chenoweth, R.D. McKay, G.E. Crawford, P.C. Scacheri, and P.J. Tesar. 2014. Epigenomic Comparison Reveals Activation of “Seed” Enhancers during Transition from Naive to Primed Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 14:854–863. doi:10.1016/j.stem.2014.05.005.
- Fang, R., K. Liu, Y. Zhao, H. Li, D. Zhu, Y. Du, C. Xiang, X. Li, H. Liu, Z. Miao, X. Zhang, Y. Shi, W. Yang, J. Xu, and H. Deng. 2014. Generation of Naive Induced Pluripotent Stem Cells from Rhesus Monkey Fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 15:488–497. doi:10.1016/j.stem.2014.09.004.
- Fehilly, C.B., S.M. Willadsen, and E.M. Tucker. 1984. Interspecific chimaerism between sheep and goat. *Nature*. 307:634–636. doi:10.1038/307634a0.
- Ficz, G., M.R. Branco, S. Seisenberger, F. Santos, F. Krueger, T.A. Hore, C.J. Marques, S. Andrews, and W. Reik. 2011. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*. 473:398–402. doi:10.1038/nature10008.
- Ficz, G., T.A. Hore, F. Santos, H.J. Lee, W. Dean, J. Arand, F. Krueger, D. Oxley, Y.-L. Paul, J. Walter, S.J. Cook, S. Andrews, M.R. Branco, and W. Reik. 2013. FGF Signaling Inhibition in ESCs Drives Rapid Genome-wide Demethylation to the Epigenetic Ground State of Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 13:351–359. doi:10.1016/j.stem.2013.06.004.

- Fischer, B., P. Chavatte-Palmer, C. Viebahn, A. Navarrete Santos, and V. Duranthon. 2012. Rabbit as a reproductive model for human health. *REPRODUCTION*. 144:1–10. doi:10.1530/REP-12-0091.
- Flach, G., M.H. Johnson, P.R. Braude, R.A. Taylor, and V.N. Bolton. 1982. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *The EMBO Journal*. 1:681–686. doi:10.1002/j.1460-2075.1982.tb01230.x.
- Frankenberg, S., F. Gerbe, S. Bessonard, C. Belville, P. Pouchin, O. Bardot, and C. Chazaud. 2011. Primitive Endoderm Differentiates via a Three-Step Mechanism Involving Nanog and RTK Signaling. *Developmental Cell*. 21:1005–1013. doi:10.1016/j.devcel.2011.10.019.
- Gafni, O., L. Weinberger, A.A. Mansour, Y.S. Manor, E. Chomsky, D. Ben-Yosef, Y. Kalma, S. Viukov, I. Maza, A. Zviran, Y. Rais, Z. Shipony, Z. Mukamel, V. Krupalnik, M. Zerbib, S. Geula, I. Caspi, D. Schneir, T. Shwartz, S. Gilad, D. Amann-Zalcenstein, S. Benjamin, I. Amit, A. Tanay, R. Massarwa, N. Novershtern, and J.H. Hanna. 2013. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*. 504:282–286. doi:10.1038/nature12745.
- Gallego Romero, I., B.J. Pavlovic, I. Hernando-Herraez, X. Zhou, M.C. Ward, N.E. Banovich, C.L. Kagan, J.E. Burnett, C.H. Huang, A. Mitrano, C.I. Chavarria, I. Friedrich Ben-Nun, Y. Li, K. Sabatini, T.R. Leonardo, M. Parast, T. Marques-Bonet, L.C. Laurent, J.F. Loring, and Y. Gilad. 2015. A panel of induced pluripotent stem cells from chimpanzees: a resource for comparative functional genomics. *eLife*. 4:e07103. doi:10.7554/eLife.07103.
- Gardner, R.L. 1968. Mouse Chimaeras obtained by the Injection of Cells into the Blastocyst. *Nature*. 220:596–597. doi:10.1038/220596a0.
- Gardner, R.L., and M.H. Johnson. 1973. Investigation of Early Mammalian Development using Interspecific Chimaeras between Rat and Mouse. *Nature New Biology*. 246:86–89. doi:10.1038/newbio246086a0.
- Gardner, R.L., and A.J. Munro. 1974. Successful construction of chimaeric rabbit. *Nature*. 250:146–147. doi:10.1038/250146a0.
- 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. *J Embryol Exp Morphol*. 52:141–152.

- Gerri, C., A. McCarthy, G. Alanis-Lobato, A. Demtschenko, A. Bruneau, S. Loubersac, N.M.E. Fogarty, D. Hampshire, K. Elder, P. Snell, L. Christie, L. David, H. Van De Velde, A.A. Fouladi-Nashta, and K.K. Niakan. 2020a. Initiation of a conserved trophectoderm program in human, cow and mouse embryos. *Nature*. 587:443–447. doi:10.1038/s41586-020-2759-x.
- Gerri, C., S. Menchero, S.K. Mahadevaiah, J.M.A. Turner, and K.K. Niakan. 2020b. Human Embryogenesis: A Comparative Perspective. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 36:411–440. doi:10.1146/annurev-cellbio-022020-024900.
- Geuder, J., L.E. Wange, A. Janjic, J. Radmer, P. Janssen, J.W. Bagnoli, S. Müller, A. Kaul, M. Ohnuki, and W. Enard. 2021. A non-invasive method to generate induced pluripotent stem cells from primate urine. *Sci Rep*. 11:3516. doi:10.1038/s41598-021-82883-0.
- Ghimire, S., V. Mantziou, N. Moris, and A. Martinez Arias. 2021. Human gastrulation: The embryo and its models. *Developmental Biology*. 474:100–108. doi:10.1016/j.ydbio.2021.01.006.
- Goto, T., H. Hara, M. Sanbo, H. Masaki, H. Sato, T. Yamaguchi, S. Hochi, T. Kobayashi, H. Nakauchi, and M. Hirabayashi. 2019. Generation of pluripotent stem cell-derived mouse kidneys in Sall1-targeted anephric rats. *Nat Commun*. 10:451. doi:10.1038/s41467-019-08394-9.
- Greber, B., H. Lehrach, and J. Adjaye. 2007. Fibroblast Growth Factor 2 Modulates Transforming Growth Factor β Signaling in Mouse Embryonic Fibroblasts and Human ESCs (hESCs) to Support hESC Self-Renewal. *Stem Cells*. 25:455–464. doi:10.1634/stemcells.2006-0476.
- Greber, B., G. Wu, C. Bernemann, J.Y. Joo, D.W. Han, K. Ko, N. Tapia, D. Sabour, J. Sternecker, P. Tesar, and H.R. Schöler. 2010. Conserved and Divergent Roles of FGF Signaling in Mouse Epiblast Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 6:215–226. doi:10.1016/j.stem.2010.01.003.
- Guo, G., M. Huss, G.Q. Tong, C. Wang, L. Li Sun, N.D. Clarke, and P. Robson. 2010. Resolution of Cell Fate Decisions Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst. *Developmental Cell*. 18:675–685. doi:10.1016/j.devcel.2010.02.012.
- Guo, G., F. Von Meyenn, M. Rostovskaya, J. Clarke, S. Dietmann, D. Baker, A. Sahakyan, S. Myers, P. Bertone, W. Reik, K. Plath, and A. Smith. 2017. Epigenetic resetting of human pluripotency. *Development*. 144:2748–2763. doi:10.1242/dev.146811.

- Guo, G., J. Yang, J. Nichols, J.S. Hall, I. Eyres, W. Mansfield, and A. Smith. 2009. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*. 136:1063–1069. doi:10.1242/dev.030957.
- Hall, J., G. Guo, J. Wray, I. Eyres, J. Nichols, L. Grotewold, S. Morfopoulou, P. Humphreys, W. Mansfield, R. Walker, S. Tomlinson, and A. Smith. 2009. Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Krüppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*. 5:597–609. doi:10.1016/j.stem.2009.11.003.
- Hanna, J., A.W. Cheng, K. Saha, J. Kim, C.J. Lengner, F. Soldner, J.P. Cassady, J. Muffat, B.W. Carey, and R. Jaenisch. 2010. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:9222–9227. doi:10.1073/pnas.1004584107.
- Harbour, J.W., and D.C. Dean. 2000. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2:E65–E67. doi:10.1038/35008695.
- Hashimoto, M., and H. Sasaki. 2019. Epiblast Formation by TEAD-YAP-Dependent Expression of Pluripotency Factors and Competitive Elimination of Unspecified Cells. *Developmental Cell*. 50:139-154.e5. doi:10.1016/j.devcel.2019.05.024.
- Hayashi, K., S.M.C.D.S. Lopes, F. Tang, and M.A. Surani. 2008. Dynamic Equilibrium and Heterogeneity of Mouse Pluripotent Stem Cells with Distinct Functional and Epigenetic States. *Cell Stem Cell*. 3:391–401. doi:10.1016/j.stem.2008.07.027.
- Hayashi, K., H. Ohta, K. Kurimoto, S. Aramaki, and M. Saitou. 2011. Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells. *Cell*. 146:519–532. doi:10.1016/j.cell.2011.06.052.
- Hohmann, T., and F. Dehghani. 2019. The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells*. 8:362. doi:10.3390/cells8040362.
- Honda, A., M. Hirose, M. Hatori, S. Matoba, H. Miyoshi, K. Inoue, and A. Ogura. 2010. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in Rabbits. *Journal of Biological Chemistry*. 285:31362–31369. doi:10.1074/jbc.M110.150540.
- Honda, A., M. Hirose, K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, N. Shimosawa, M. Hatori, N. Shimizu, T. Murata, M. Hirose, K. Katayama, N. Wakisaka, H. Miyoshi, K.K. Yokoyama, T. Sankai, and A. Ogura. 2008. Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. *Reproductive BioMedicine Online*. 17:706–715. doi:10.1016/S1472-6483(10)60320-3.

- Honda, A., M. Hirose, and A. Ogura. 2009. Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. *Experimental Cell Research*. 315:2033–2042. doi:10.1016/j.yexcr.2009.01.024.
- Hu, Z., H. Li, H. Jiang, Y. Ren, X. Yu, J. Qiu, A.B. Stablewski, B. Zhang, M.J. Buck, and J. Feng. 2020. Transient inhibition of mTOR in human pluripotent stem cells enables robust formation of mouse-human chimeric embryos. *Sci. Adv.* 6:eaaz0298. doi:10.1126/sciadv.aaz0298.
- Huang, J., K. Deng, H. Wu, Z. Liu, Z. Chen, S. Cao, L. Zhou, X. Ye, D.L. Keefe, and L. Liu. 2008. Efficient Production of Mice from Embryonic Stem Cells Injected into Four- or Eight-Cell Embryos by Piezo Micromanipulation. *Stem Cells*. 26:1883–1890. doi:10.1634/stemcells.2008-0164.
- Huang, K., Y. Zhu, Y. Ma, B. Zhao, N. Fan, Y. Li, H. Song, S. Chu, Z. Ouyang, Q. Zhang, Q. Xing, C. Lai, N. Li, T. Zhang, J. Gu, B. Kang, Y. Shan, K. Lai, W. Huang, Y. Mai, Q. Wang, J. Li, A. Lin, Y. Zhang, X. Zhong, B. Liao, L. Lai, J. Chen, D. Pei, and G. Pan. 2018. BMI1 enables interspecies chimerism with human pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 9:4649. doi:10.1038/s41467-018-07098-w.
- Huang, Y., R. Osorno, A. Tsakiridis, and V. Wilson. 2012. In Vivo Differentiation Potential of Epiblast Stem Cells Revealed by Chimeric Embryo Formation. *Cell Reports*. 2:1571–1578. doi:10.1016/j.celrep.2012.10.022.
- Humphrey, J.D., E.R. Dufresne, and M.A. Schwartz. 2014. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:802–812. doi:10.1038/nrm3896.
- Ivanova, N., R. Dobrin, R. Lu, I. Kotenko, J. Levorse, C. DeCoste, X. Schafer, Y. Lun, and I.R. Lemischka. 2006. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*. 442:533–538. doi:10.1038/nature04915.
- Iyer, D.P., V.A.V.D. Weijden, H.H. Khoei, A. McCarthy, T. Rayon, C.S. Simon, I. Dunkel, S.E. Wamaitha, K. Elder, P. Snell, L. Christie, E.G. Schulz, K.K. Niakan, N. Rivron, and A. Bulut-Karslioglu. 2023. Delay of human early development via in vitro diapause. doi:10.1101/2023.05.29.541316.
- Janiszewska, M., M.C. Primi, and T. Izard. 2020. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *Journal of Biological Chemistry*. 295:2495–2505. doi:10.1074/jbc.REV119.007759.

- Jiang, J., Y.-S. Chan, Y.-H. Loh, J. Cai, G.-Q. Tong, C.-A. Lim, P. Robson, S. Zhong, and H.-H. Ng. 2008. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 10:353–360. doi:10.1038/ncb1698.
- Jiang, Y., Z. Kou, T. Wu, W. An, R. Zhou, H. Wang, Y. Gao, and S. Gao. 2014. Xist Deficiency and Disorders of X-Inactivation in Rabbit Embryonic Stem Cells Can Be Rescued by Transcription-Factor-Mediated Conversion. *Stem Cells and Development.* 23:2283–2296. doi:10.1089/scd.2014.0011.
- Jin, D.I., D.K. Kim, K.S. Im, and W.S. Choi. 2000. Successful pregnancy after transfer of rabbit blastocysts grown in vitro from single-cell zygotes. *Theriogenology.* 54:1109–1116. doi:10.1016/S0093-691X(00)00419-2.
- Johnson, M.H., and C.A. Ziomek. 1981. Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability. *The Journal of cell biology.* 91:303–308. doi:10.1083/jcb.91.1.303.
- Junqueira Alves, C., R. Dariolli, J. Haydak, S. Kang, T. Hannah, R.J. Wiener, S. DeFronzo, R. Tejero, G.L. Gusella, A. Ramakrishnan, R. Alves Dias, A. Wojcinski, S. Kesari, L. Shen, E.A. Sobie, J.P. Rodrigues Furtado De Mendonça, E.U. Azeloglu, H. Zou, and R.H. Friedel. 2021. Plexin-B2 orchestrates collective stem cell dynamics via actomyosin contractility, cytoskeletal tension and adhesion. *Nat Commun.* 12:6019. doi:10.1038/s41467-021-26296-7.
- Kalkan, T., S. Bornelöv, C. Mulas, E. Diamanti, T. Lohoff, M. Ralser, S. Middelkamp, P. Lombard, J. Nichols, and A. Smith. 2019. Complementary Activity of ETV5, RBPJ, and TCF3 Drives Formative Transition from Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell.* 24:785-801.e7. doi:10.1016/j.stem.2019.03.017.
- Kalkan, T., N. Olova, M. Roode, C. Mulas, H.J. Lee, I. Nett, H. Marks, R. Walker, H.G. Stunnenberg, K.S. Lilley, J. Nichols, W. Reik, P. Bertone, and A. Smith. 2017. Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency. *Development.* dev.142711. doi:10.1242/dev.142711.
- Kalous, J., D. Aleshkina, and M. Anger. 2023. A Role of PI3K/Akt Signaling in Oocyte Maturation and Early Embryo Development. *Cells.* 12:1830. doi:10.3390/cells12141830.
- Kang, M., A. Piliszek, J. Artus, and A.-K. Hadjantonakis. 2013. FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Development.* 140:267–279. doi:10.1242/dev.084996.

- Kania, A., and R. Klein. 2016. Mechanisms of ephrin–Eph signalling in development, physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17:240–256. doi:10.1038/nrm.2015.16.
- Kim, H., J. Wu, S. Ye, C.-I. Tai, X. Zhou, H. Yan, P. Li, M. Pera, and Q.-L. Ying. 2013. Modulation of β -catenin function maintains mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell self-renewal. *Nat Commun.* 4:2403. doi:10.1038/ncomms3403.
- Kinoshita, M., M. Barber, W. Mansfield, Y. Cui, D. Spindlow, G.G. Stirparo, S. Dietmann, J. Nichols, and A. Smith. 2021. Capture of Mouse and Human Stem Cells with Features of Formative Pluripotency. *Cell Stem Cell.* 28:453-471.e8. doi:10.1016/j.stem.2020.11.005.
- Kinoshita, M., and A. Smith. 2018. Pluripotency Deconstructed. *Dev Growth Differ.* 60:44–52. doi:10.1111/dgd.12419.
- Kitahara, A., Q. Ran, K. Oda, A. Yasue, M. Abe, X. Ye, T. Sasaoka, M. Tsuchida, K. Sakimura, Y. Ajioka, Y. Saijo, and Q. Zhou. 2020. Generation of Lungs by Blastocyst Complementation in Apneumatic Fgf10-Deficient Mice. *Cell Reports.* 31:107626. doi:10.1016/j.celrep.2020.107626.
- Klein, R. 2012. Eph/ephrin signalling during development. *Development.* 139:4105–4109. doi:10.1242/dev.074997.
- Kobayashi, S., Y. Hosoi, H. Shiura, K. Yamagata, S. Takahashi, Y. Fujihara, T. Kohda, M. Okabe, and F. Ishino. 2016. Live imaging of X chromosome reactivation dynamics in early mouse development can discriminate naïve from primed pluripotent stem cells. *Development.* dev.136739. doi:10.1242/dev.136739.
- Kobayashi, T., A. Castillo-Venzor, C.A. Penfold, M. Morgan, N. Mizuno, W.W.C. Tang, Y. Osada, M. Hirao, F. Yoshida, H. Sato, H. Nakauchi, M. Hirabayashi, and M.A. Surani. 2021. Tracing the emergence of primordial germ cells from bilaminar disc rabbit embryos and pluripotent stem cells. *Cell Reports.* 37:109812. doi:10.1016/j.celrep.2021.109812.
- Kobayashi, T., T. Yamaguchi, S. Hamanaka, M. Kato-Itoh, Y. Yamazaki, M. Ibata, H. Sato, Y.-S. Lee, J. Usui, A.S. Knisely, M. Hirabayashi, and H. Nakauchi. 2010. Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells. *Cell.* 142:787–799. doi:10.1016/j.cell.2010.07.039.

- Kohler, T.N., J. De Jonghe, A.L. Ellermann, A. Yanagida, M. Herger, E.M. Slatery, A. Weberling, C. Munger, K. Fischer, C. Mulas, A. Winkel, C. Ross, S. Bergmann, K. Franze, K. Chalut, J. Nichols, T.E. Boroviak, and F. Hollfelder. 2023. Plakoglobin is a mechanoresponsive regulator of naive pluripotency. *Nat Commun.* 14:4022. doi:10.1038/s41467-023-39515-0.
- Kojima, Y., K. Kaufman-Francis, J.B. Studdert, K.A. Steiner, M.D. Power, D.A.F. Loebel, V. Jones, A. Hor, G. de Alencastro, G.J. Logan, E.T. Teber, O.H. Tam, M.D. Stutz, I.E. Alexander, H.A. Pickett, and P.P.L. Tam. 2014. The Transcriptional and Functional Properties of Mouse Epiblast Stem Cells Resemble the Anterior Primitive Streak. *Cell Stem Cell.* 14:107–120. doi:10.1016/j.stem.2013.09.014.
- Kraus, P., G. Leong, V. Tan, X. Xing, J.W. Goh, S.P. Yap, and T. Lufkin. 2010. A more cost effective and rapid high percentage germ-line transmitting chimeric mouse generation procedure via microinjection of 2-cell, 4-cell, and 8-cell embryos with ES and iPS cells. *Genesis.* 48:394–399. doi:10.1002/dvg.20627.
- Kunath, T., M.K. Saba-El-Leil, M. Almousailleakh, J. Wray, S. Meloche, and A. Smith. 2007. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development.* 134:2895–2902. doi:10.1242/dev.02880.
- Kurimoto, K. 2006. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Research.* 34:e42–e42. doi:10.1093/nar/gkl050.
- Lane, D.P. 1992. p53, guardian of the genome. *Nature.* 358:15–16. doi:10.1038/358015a0.
- Leitch, H.G., K.R. McEwen, A. Turp, V. Encheva, T. Carroll, N. Grabole, W. Mansfield, B. Nashun, J.G. Knezovich, A. Smith, M.A. Surani, and P. Hajkova. 2013. Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nat Struct Mol Biol.* 20:311–316. doi:10.1038/nsmb.2510.
- Levental, K.R., H. Yu, L. Kass, J.N. Lakins, M. Egeblad, J.T. Erler, S.F.T. Fong, K. Csiszar, A. Giaccia, W. Weninger, M. Yamauchi, D.L. Gasser, and V.M. Weaver. 2009. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell.* 139:891–906. doi:10.1016/j.cell.2009.10.027.
- Lim, C.Y., B.B. Knowles, D. Solter, and D.M. Messerschmidt. 2016. Epigenetic Control of Early Mouse Development. In *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier. 311–360.

- Lima, A., G. Lubatti, J. Burgstaller, D. Hu, A.P. Green, A. Di Gregorio, T. Zawadzki, B. Pernaute, E. Mahammadov, S. Perez-Montero, M. Dore, J.M. Sanchez, S. Bowling, M. Sancho, T. Kolbe, M.M. Karimi, D. Carling, N. Jones, S. Srinivas, A. Scialdone, and T.A. Rodriguez. 2021. Cell competition acts as a purifying selection to eliminate cells with mitochondrial defects during early mouse development. *Nat Metab.* 3:1091–1108. doi:10.1038/s42255-021-00422-7.
- Lin, J., C. Zeng, J. Zhang, Z. Song, N. Qi, X. Liu, Z. Zhang, A. Li, and F. Chen. 2021. EFNA4 promotes cell proliferation and tumor metastasis in hepatocellular carcinoma through a PIK3R2/GSK3 β / β -catenin positive feedback loop. *Molecular Therapy - Nucleic Acids.* 25:328–341. doi:10.1016/j.omtn.2021.06.002.
- Liu, C., R. Wang, Z. He, P. Osteil, E. Wilkie, X. Yang, J. Chen, G. Cui, W. Guo, Y. Chen, G. Peng, P.P.L. Tam, and N. Jing. 2018. Suppressing Nodal Signaling Activity Predisposes Ectodermal Differentiation of Epiblast Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 11:43–57. doi:10.1016/j.stemcr.2018.05.019.
- Liu, H., F. Zhu, J. Yong, P. Zhang, P. Hou, H. Li, W. Jiang, J. Cai, M. Liu, K. Cui, X. Qu, T. Xiang, D. Lu, X. Chi, G. Gao, W. Ji, M. Ding, and H. Deng. 2008. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Adult Rhesus Monkey Fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 3:587–590. doi:10.1016/j.stem.2008.10.014.
- Loh, Y.-H., Q. Wu, J.-L. Chew, V.B. Vega, W. Zhang, X. Chen, G. Bourque, J. George, B. Leong, J. Liu, K.-Y. Wong, K.W. Sung, C.W.H. Lee, X.-D. Zhao, K.-P. Chiu, L. Lipovich, V.A. Kuznetsov, P. Robson, L.W. Stanton, C.-L. Wei, Y. Ruan, B. Lim, and H.-H. Ng. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet.* 38:431–440. doi:10.1038/ng1760.
- Love, M.I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15:550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
- Luo, Q., H. Pui, J. Chen, L. Yu, P.R. Jannig, Y. Pei, L. Zhao, X. Chen, S. Petropoulos, J.L. Ruas, J. Wu, and Q. Deng. 2023. Epiblast-like stem cells established by Wnt/ β -catenin signaling manifest distinct features of formative pluripotency and germline competence. *Cell Reports.* 42:112021. doi:10.1016/j.celrep.2023.112021.
- Madeja, Z.E., P. Pawlak, and A. Piliszek. 2019. Beyond the mouse: non-rodent animal models for study of early mammalian development and biomedical research. *Int. J. Dev. Biol.* 63:187–201. doi:10.1387/ijdb.180414ap.

- Marks, H., T. Kalkan, R. Menafra, S. Denissov, K. Jones, H. Hofemeister, J. Nichols, A. Kranz, A. Francis Stewart, A. Smith, and H.G. Stunnenberg. 2012. The Transcriptional and Epigenomic Foundations of Ground State Pluripotency. *Cell*. 149:590–604. doi:10.1016/j.cell.2012.03.026.
- Martello, G., P. Bertone, and A. Smith. 2013. Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *EMBO J*. 32:2561–2574. doi:10.1038/emboj.2013.177.
- Martello, G., T. Sugimoto, E. Diamanti, A. Joshi, R. Hannah, S. Ohtsuka, B. Göttgens, H. Niwa, and A. Smith. 2012. Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*. 11:491–504. doi:10.1016/j.stem.2012.06.008.
- Martin, G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:7634–7638. doi:10.1073/pnas.78.12.7634.
- Masaki, H., M. Kato-Itoh, Y. Takahashi, A. Umino, H. Sato, K. Ito, A. Yanagida, T. Nishimura, T. Yamaguchi, M. Hirabayashi, T. Era, K.M. Loh, S.M. Wu, I.L. Weissman, and H. Nakauchi. 2016. Inhibition of Apoptosis Overcomes Stage-Related Compatibility Barriers to Chimera Formation in Mouse Embryos. *Cell Stem Cell*. 19:587–592. doi:10.1016/j.stem.2016.10.013.
- Masaki, H., M. Kato-Itoh, A. Umino, H. Sato, S. Hamanaka, T. Kobayashi, T. Yamaguchi, K. Nishimura, M. Ohtaka, M. Nakanishi, and H. Nakauchi. 2015. Interspecific in vitro assay for the chimera-forming ability of human pluripotent stem cells. *Development*. dev.124016. doi:10.1242/dev.124016.
- Mascetti, V.L., and R.A. Pedersen. 2016. Human-Mouse Chimerism Validates Human Stem Cell Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 18:67–72. doi:10.1016/j.stem.2015.11.017.
- Masui, S., Y. Nakatake, Y. Toyooka, D. Shimosato, R. Yagi, K. Takahashi, H. Okochi, A. Okuda, R. Matoba, A.A. Sharov, M.S.H. Ko, and H. Niwa. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 9:625–635. doi:10.1038/ncb1589.
- Mazid, Md.A., C. Ward, Z. Luo, C. Liu, Y. Li, Y. Lai, L. Wu, J. Li, W. Jia, Y. Jiang, H. Liu, L. Fu, Y. Yang, D.P. Ibañez, J. Lai, X. Wei, J. An, P. Guo, Y. Yuan, Q. Deng, Y. Wang, Y. Liu, F. Gao, J. Wang, S. Zaman, B. Qin, G. Wu, P.H. Maxwell, X. Xu, L. Liu, W. Li, and M.A. Esteban. 2022. Rolling back human pluripotent stem cells to an eight-cell embryo-like stage. *Nature*. 605:315–324. doi:10.1038/s41586-022-04625-0.

- McLaren, A. 1976. Mammalian chimaeras. Cambridge : Cambridge University Press. 154 pp.
- McLaren, A., and P. Bowman. 1969. Mouse Chimaeras derived from Fusion of Embryos differing by Nine Genetic Factors. *Nature*. 224:238–240. doi:10.1038/224238a0.
- Meistermann, D., A. Bruneau, S. Loubersac, A. Reignier, J. Firmin, V. François-Campion, S. Kilens, Y. Lelièvre, J. Lammers, M. Feyeux, P. Hulin, S. Nedellec, B. Bretin, G. Castel, N. Allègre, S. Covin, A. Bihouée, M. Soumillon, T. Mikkelsen, P. Barrière, C. Chazaud, J. Chappell, V. Pasque, J. Bourdon, T. Fréour, and L. David. 2021. Integrated pseudotime analysis of human pre-implantation embryo single-cell transcriptomes reveals the dynamics of lineage specification. *Cell Stem Cell*. 28:1625-1640.e6. doi:10.1016/j.stem.2021.04.027.
- Meyer, S.N., M. Amoyel, C. Bergantiños, C. De La Cova, C. Schertel, K. Basler, and L.A. Johnston. 2014. An ancient defense system eliminates unfit cells from developing tissues during cell competition. *Science*. 346:1258236. doi:10.1126/science.1258236.
- Mintz, B. 1965. Genetic Mosaicism in Adult Mice of Quadriparental Lineage. *Science*. 148:1232–1233. doi:10.1126/science.148.3674.1232.
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, and S. Yamanaka. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 113:631–642. doi:10.1016/s0092-8674(03)00393-3.
- Mohammed, H., I. Hernando-Herraez, A. Savino, A. Scialdone, I. Macaulay, C. Mulas, T. Chandra, T. Voet, W. Dean, J. Nichols, J.C. Marioni, and W. Reik. 2017. Single-Cell Landscape of Transcriptional Heterogeneity and Cell Fate Decisions during Mouse Early Gastrulation. *Cell Reports*. 20:1215–1228. doi:10.1016/j.celrep.2017.07.009.
- Mora-Bermúdez, F., F. Badsha, S. Kanton, J.G. Camp, B. Vernet, K. Köhler, B. Voigt, K. Okita, T. Maricic, Z. He, R. Lachmann, S. Pääbo, B. Treutlein, and W.B. Huttner. 2016. Differences and similarities between human and chimpanzee neural progenitors during cerebral cortex development. *eLife*. 5:e18683. doi:10.7554/eLife.18683.
- Mulas, C., M. Stammers, S.I. Salomaa, C. Heinzen, D.M. Suter, A. Smith, and K.J. Chalut. 2023. ERK signalling orchestrates metachronous transition from naïve to formative pluripotency. doi:10.1101/2023.07.20.549835.
- Mulnard, J. 1973. [Formation of chimeric blastocysts by fusion of rat and mice embryos at stage 8]. *C R Acad Hebd Seances Acad Sci D*. 276:379–381.

- Murphy, B.D. 2020. Under Arrest: The Embryo in Diapause. *Developmental Cell*. 52:139–140. doi:10.1016/j.devcel.2020.01.002.
- Mystkowska, E.T. 1975. Development of mouse-bank vole interspecific chimaeric embryos. *J Embryol Exp Morphol*. 33:731–744.
- Nagy, A., E. Góczy, E.M. Diaz, V.R. Prideaux, E. Iványi, M. Markula, and J. Rossant. 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*. 110:815–821. doi:10.1242/dev.110.3.815.
- Nakai, R., M. Ohnuki, K. Kuroki, H. Ito, H. Hirai, R. Kitajima, T. Fujimoto, M. Nakagawa, W. Enard, and M. Imamura. 2018. Derivation of induced pluripotent stem cells in Japanese macaque (*Macaca fuscata*). *Sci Rep*. 8:12187. doi:10.1038/s41598-018-30734-w.
- Nakamura, T., I. Okamoto, K. Sasaki, Y. Yabuta, C. Iwatani, H. Tsuchiya, Y. Seita, S. Nakamura, T. Yamamoto, and M. Saitou. 2016. A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys and humans. *Nature*. 537:57–62. doi:10.1038/nature19096.
- Niakan, K.K., and K. Eggan. 2013. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Developmental Biology*. 375:54–64. doi:10.1016/j.ydbio.2012.12.008.
- Niakan, K.K., J. Han, R.A. Pedersen, C. Simon, and R.A.R. Pera. 2012. Human pre-implantation embryo development. *Development*. 139:829–841. doi:10.1242/dev.060426.
- Nichols, J., and A. Smith. 2009. Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell*. 4:487–492. doi:10.1016/j.stem.2009.05.015.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler, and A. Smith. 1998. Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell*. 95:379–391. doi:10.1016/S0092-8674(00)81769-9.
- Nishioka, N., K. Inoue, K. Adachi, H. Kiyonari, M. Ota, A. Ralston, N. Yabuta, S. Hirahara, R.O. Stephenson, N. Ogonuki, R. Makita, H. Kurihara, E.M. Morin-Kensicki, H. Nojima, J. Rossant, K. Nakao, H. Niwa, and H. Sasaki. 2009. The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass. *Developmental Cell*. 16:398–410. doi:10.1016/j.devcel.2009.02.003.

- Nishioka, N., S. Yamamoto, H. Kiyonari, H. Sato, A. Sawada, M. Ota, K. Nakao, and H. Sasaki. 2008. Tead4 is required for specification of trophoctoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mechanisms of Development*. 125:270–283. doi:10.1016/j.mod.2007.11.002.
- Niwa, H., T. Burdon, I. Chambers, and A. Smith. 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*. 12:2048–2060. doi:10.1101/gad.12.13.2048.
- Niwa, H., J. Miyazaki, and A.G. Smith. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 24:372–376. doi:10.1038/74199.
- Niwa, H., K. Ogawa, D. Shimosato, and K. Adachi. 2009. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*. 460:118–122. doi:10.1038/nature08113.
- Niwa, H., Y. Toyooka, D. Shimosato, D. Strumpf, K. Takahashi, R. Yagi, and J. Rossant. 2005. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophoctoderm Differentiation. *Cell*. 123:917–929. doi:10.1016/j.cell.2005.08.040.
- Noli, L., Y. Dajani, A. Capalbo, J. Bvumbe, L. Rienzi, F.M. Ubaldi, C. Ogilvie, Y. Khalaf, and D. Ilic. 2015. Developmental clock compromises human twin model created by embryo splitting. *Hum. Reprod. dev*252. doi:10.1093/humrep/dev252.
- Nordenfelt, P., H.L. Elliott, and T.A. Springer. 2016. Coordinated integrin activation by actin-dependent force during T-cell migration. *Nat Commun*. 7:13119. doi:10.1038/ncomms13119.
- O'Brien, M.A., and R. Kirby. 2008. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *J Vet Emergen Crit Care*. 18:572–585. doi:10.1111/j.1476-4431.2008.00363.x.
- Ohinata, Y., H. Ohta, M. Shigeta, K. Yamanaka, T. Wakayama, and M. Saitou. 2009. A Signaling Principle for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice. *Cell*. 137:571–584. doi:10.1016/j.cell.2009.03.014.
- Okamoto, I., C. Patrat, D. Thépot, N. Peynot, P. Fauque, N. Daniel, P. Diabangouaya, J.-P. Wolf, J.-P. Renard, V. Duranthon, and E. Heard. 2011. Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature*. 472:370–374. doi:10.1038/nature09872.

- Osorno, R., A. Tsakiridis, F. Wong, N. Cambray, C. Economou, R. Wilkie, G. Blin, P.J. Scotting, I. Chambers, and V. Wilson. 2012. The developmental dismantling of pluripotency is reversed by ectopic Oct4 expression. *Development*. 139:2288–2298. doi:10.1242/dev.078071.
- Osteil, P., A. Moulin, C. Santamaria, T. Joly, L. Jouneau, M. Aubry, Y. Tapponnier, C. Archilla, B. Schmaltz-Panneau, J. Lecardonnell, H. Barasc, N. Mouney-Bonnet, C. Genthon, A. Roulet, C. Donnadiou, H. Acloque, E. Gocza, V. Duranthon, M. Afanassieff, and P. Savatier. 2016. A Panel of Embryonic Stem Cell Lines Reveals the Variety and Dynamic of Pluripotent States in Rabbits. *Stem Cell Reports*. 7:383–398. doi:10.1016/j.stemcr.2016.07.022.
- Osteil, P., Y. Tapponnier, S. Markossian, M. Godet, B. Schmaltz-Panneau, L. Jouneau, C. Cabau, T. Joly, T. Blachère, E. Góczy, A. Bernat, M. Yerle, H. Acloque, S. Hidot, Z. Bosze, V. Duranthon, P. Savatier, and M. Afanassieff. 2013. Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naïve pluripotency. *Biology Open*. 2:613–628. doi:10.1242/bio.20134242.
- Paling, N.R.D., H. Wheadon, H.K. Bone, and M.J. Welham. 2004. Regulation of Embryonic Stem Cell Self-renewal by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 279:48063–48070. doi:10.1074/jbc.M406467200.
- Pastor, W.A., D. Chen, W. Liu, R. Kim, A. Sahakyan, A. Lukianchikov, K. Plath, S.E. Jacobsen, and A.T. Clark. 2016. Naive Human Pluripotent Cells Feature a Methylation Landscape Devoid of Blastocyst or Germline Memory. *Cell Stem Cell*. 18:323–329. doi:10.1016/j.stem.2016.01.019.
- Pastor, W.A., W. Liu, D. Chen, J. Ho, R. Kim, T.J. Hunt, A. Lukianchikov, X. Liu, J.M. Polo, S.E. Jacobsen, and A.T. Clark. 2018. TFAP2C regulates transcription in human naive pluripotency by opening enhancers. *Nat Cell Biol*. 20:553–564. doi:10.1038/s41556-018-0089-0.
- Pereira, L., F. Yi, and B.J. Merrill. 2006. Repression of Nanog Gene Transcription by Tcf3 Limits Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Molecular and Cellular Biology*. 26:7479–7491. doi:10.1128/MCB.00368-06.
- Petropoulos, S., D. Edsgård, B. Reinius, Q. Deng, S.P. Panula, S. Codeluppi, A. Plaza Reyes, S. Linnarsson, R. Sandberg, and F. Lanner. 2016. Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Cell*. 165:1012–1026. doi:10.1016/j.cell.2016.03.023.

- Piliszek, A., J.B. Grabarek, S.R. Frankenberg, and B. Plusa. 2016. Cell fate in animal and human blastocysts and the determination of viability. *Mol. Hum. Reprod.* 22:681–690. doi:10.1093/molehr/gaw002.
- Plusa, B., A. Piliszek, S. Frankenberg, J. Artus, and A.-K. Hadjantonakis. 2008. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development.* 135:3081–3091. doi:10.1242/dev.021519.
- Renfree, M.B., and J.C. Fenelon. 2017. The enigma of embryonic diapause. *Development.* 144:3199–3210. doi:10.1242/dev.148213.
- Rodda, D.J., J.-L. Chew, L.-H. Lim, Y.-H. Loh, B. Wang, H.-H. Ng, and P. Robson. 2005. Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *Journal of Biological Chemistry.* 280:24731–24737. doi:10.1074/jbc.M502573200.
- Roode, M., K. Blair, P. Snell, K. Elder, S. Marchant, A. Smith, and J. Nichols. 2012. Human hypoblast formation is not dependent on FGF signalling. *Developmental Biology.* 361:358–363. doi:10.1016/j.ydbio.2011.10.030.
- Roodgar, M., F.P. Suchy, L.H. Nguyen, V.K. Bajpai, R. Sinha, J.G. Vilches-Moure, K. Van Bortle, J. Bhadury, A. Metwally, L. Jiang, R. Jian, R. Chiang, A. Oikonomopoulos, J.C. Wu, I.L. Weissman, J.L. Mankowski, S. Holmes, K.M. Loh, H. Nakauchi, C.A. VandeVoort, and M.P. Snyder. 2022. Chimpanzee and pig-tailed macaque iPSCs: Improved culture and generation of primate cross-species embryos. *Cell Reports.* 40:111264. doi:10.1016/j.celrep.2022.111264.
- Rosner, M.H., M.A. Vigano, K. Ozato, P.M. Timmons, F. Poirie, P.W.J. Rigby, and L.M. Staudt. 1990. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature.* 345:686–692. doi:10.1038/345686a0.
- Rossant, J. 1975. Investigation of the determinative state of the mouse inner cell mass. I. Aggregation of isolated inner cell masses with morulae. *J Embryol Exp Morphol.* 33:979–990.
- Rossant, J. 1976. Investigation of inner cell mass determination by aggregation of isolated rat inner cell masses with mouse morulae. *J Embryol Exp Morphol.* 36:163–174.
- Rossant, J. 2024. Why study human embryo development? *Developmental Biology.* S0012160624000198. doi:10.1016/j.ydbio.2024.02.001.
- Rossant, J., B.A. Croy, D.A. Clark, and V.M. Chapman. 1983. Interspecific hybrids and chimeras in mice. *J. Exp. Zool.* 228:223–233. doi:10.1002/jez.1402280208.

- Rossant, J., and W.T. Lis. 1979. Potential of isolated mouse inner cell masses to form trophectoderm derivatives in vivo. *Developmental Biology*. 70:255–261. doi:10.1016/0012-1606(79)90022-8.
- Runel, G., N. Lopez-Ramirez, J. Chlasta, and I. Masse. 2021. Biomechanical Properties of Cancer Cells. *Cells*. 10:887. doi:10.3390/cells10040887.
- Sakurai, A., C. Doci, and J.S. Gutkind. 2012. Semaphorin signaling in angiogenesis, lymphangiogenesis and cancer. *Cell Res*. 22:23–32. doi:10.1038/cr.2011.198.
- Sancho, M., A. Di-Gregorio, N. George, S. Pozzi, J.M. Sánchez, B. Pernaute, and T.A. Rodríguez. 2013. Competitive Interactions Eliminate Unfit Embryonic Stem Cells at the Onset of Differentiation. *Developmental Cell*. 26:19–30. doi:10.1016/j.devcel.2013.06.012.
- Saraswathibhatla, A., D. Indana, and O. Chaudhuri. 2023. Cell–extracellular matrix mechanotransduction in 3D. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 24:495–516. doi:10.1038/s41580-023-00583-1.
- Sasaki, E., K. Hanazawa, R. Kurita, A. Akatsuka, T. Yoshizaki, H. Ishii, Y. Tanioka, Y. Ohnishi, H. Suemizu, A. Sugawara, N. Tamaoki, K. Izawa, Y. Nakazaki, H. Hamada, H. Suemori, S. Asano, N. Nakatsuji, H. Okano, and K. Tani. 2005. Establishment of Novel Embryonic Stem Cell Lines Derived from the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). *STEM CELLS*. 23:1304–1313. doi:10.1634/stemcells.2004-0366.
- Saunders, T.L. 2020. The History of Transgenesis. In *Transgenic Mouse*. M.A. Larson, editor. Springer US, New York, NY. 1–26.
- Savatier, P., S. Huang, L. Szekely, K.G. Wiman, and J. Samarut. 1994. Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts. *Oncogene*. 9:809–818.
- Savatier, P., H. Lapillonne, L.A. van Grunsven, B.B. Rudkin, and J. Samarut. 1996. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene*. 12:309–322.
- Schrode, N., N. Saiz, S. Di Talia, and A.-K. Hadjantonakis. 2014. GATA6 Levels Modulate Primitive Endoderm Cell Fate Choice and Timing in the Mouse Blastocyst. *Developmental Cell*. 29:454–467. doi:10.1016/j.devcel.2014.04.011.

- Schrode, N., P. Xenopoulos, A. Piliszek, S. Frankenberg, B. Plusa, and A.-K. Hadjantonakis. 2013. Anatomy of a blastocyst: Cell behaviors driving cell fate choice and morphogenesis in the early mouse embryo: Anatomy of a Blastocyst. *genesis*. 51:219–233. doi:10.1002/dvg.22368.
- Schulz, E.G., and E. Heard. 2013. Role and control of X chromosome dosage in mammalian development. *Current Opinion in Genetics & Development*. 23:109–115. doi:10.1016/j.gde.2013.01.008.
- Shahbazi, M.N. 2020. Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back. *Development*. 147:dev190629. doi:10.1242/dev.190629.
- Shimozawa, N., S. Nakamura, I. Takahashi, M. Hatori, and T. Sankai. 2010. Characterization of a novel embryonic stem cell line from an ICSI-derived blastocyst in the African green monkey. *REPRODUCTION*. 139:565–573. doi:10.1530/REP-09-0067.
- Silva, J., J. Nichols, T.W. Theunissen, G. Guo, A.L. van Oosten, O. Barrandon, J. Wray, S. Yamanaka, I. Chambers, and A. Smith. 2009. Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell*. 138:722–737. doi:10.1016/j.cell.2009.07.039.
- Simerly, C., D. McFarland, C. Castro, C.-C. Lin, C. Redinger, E. Jacoby, J. Mich-Basso, K. Orwig, P. Mills, E. Ahrens, C. Navara, and G. Schatten. 2011. Interspecies chimera between primate embryonic stem cells and mouse embryos: Monkey ESCs engraft into mouse embryos, but not post-implantation fetuses. *Stem Cell Research*. 7:28–40. doi:10.1016/j.scr.2011.03.002.
- Simerly, C.R., C.S. Navara, C.A. Castro, J.C. Turpin, C.J. Redinger, J.D. Mich-Basso, E.S. Jacoby, K.J. Grund, D.A. McFarland, S.L. Oliver, A. Ben-Yehudah, D.L. Carlisle, P. Frost, C. Penedo, L. Hewitson, and G. Schatten. 2009. Establishment and characterization of baboon embryonic stem cell lines: An Old World Primate model for regeneration and transplantation research. *Stem Cell Research*. 2:178–187. doi:10.1016/j.scr.2009.02.004.
- Singh, A.M., T. Hamazaki, K.E. Hankowski, and N. Terada. 2007. A Heterogeneous Expression Pattern for Nanog in Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 25:2534–2542. doi:10.1634/stemcells.2007-0126.
- Sivaraman, L., M. Horimoto, M. Tassinari, M. Hurtt, and G. Cappon. 2008. Timing of Implantation and Closure of the Palatal Shelf in New Zealand White and Japanese White Rabbits. *Drug and Chemical Toxicology*. 31:255–261. doi:10.1080/01480540701873236.

- Smith, A. 2017. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. *Development*. 144:365–373. doi:10.1242/dev.142679.
- Smith, A.G., J.K. Heath, D.D. Donaldson, G.G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, and D. Rogers. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 336:688–690. doi:10.1038/336688a0.
- Smith, Z.D., M.M. Chan, K.C. Humm, R. Karnik, S. Mekhoubad, A. Regev, K. Eggan, and A. Meissner. 2014. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature*. 511:611–615. doi:10.1038/nature13581.
- Smith, Z.D., M.M. Chan, T.S. Mikkelsen, H. Gu, A. Gnirke, A. Regev, and A. Meissner. 2012. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature*. 484:339–344. doi:10.1038/nature10960.
- Smith, Z.D., and A. Meissner. 2013. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 14:204–220. doi:10.1038/nrg3354.
- Stahl, N., T.G. Boulton, T. Farruggella, N.Y. Ip, S. Davis, B.A. Witthuhn, F.W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini, J.N. Ihle, and G.D. Yancopoulos. 1994. Association and Activation of Jak-Tyk Kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 β Receptor Components. *Science*. 263:92–95. doi:10.1126/science.8272873.
- Stead, E., J. White, R. Faast, S. Conn, S. Goldstone, J. Rathjen, U. Dhingra, P. Rathjen, D. Walker, and S. Dalton. 2002. Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene*. 21:8320–8333. doi:10.1038/sj.onc.1206015.
- Stirparo, G.G., T. Boroviak, G. Guo, J. Nichols, A. Smith, and P. Bertone. 2018. Integrated analysis of single-cell embryo data yields a unified transcriptome signature for the human preimplantation epiblast. *Development*. dev.158501. doi:10.1242/dev.158501.
- Storm, M.P., H.K. Bone, C.G. Beck, P.-Y. Bourillot, V. Schreiber, T. Damiano, A. Nelson, P. Savatier, and M.J. Welham. 2007. Regulation of Nanog Expression by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling in Murine Embryonic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 282:6265–6273. doi:10.1074/jbc.M610906200.
- Storm, M.P., B. Kumpfmüller, B. Thompson, R. Kolde, J. Vilo, O. Hummel, H. Schulz, and M.J. Welham. 2009. Characterization of the Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Transcriptome in Murine Embryonic Stem Cells: Identification of Novel Regulators of Pluripotency. *Stem Cells*. 27:764–775. doi:10.1002/stem.3.

- Strumpf, D., C.-A. Mao, Y. Yamanaka, A. Ralston, K. Chawengsaksophak, F. Beck, and J. Rossant. 2005. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst. *Development*. 132:2093–2102. doi:10.1242/dev.01801.
- Suemori, H., T. Tada, R. Torii, Y. Hosoi, K. Kobayashi, H. Imahie, Y. Kondo, A. Iritani, and N. Nakatsuji. 2001. Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Developmental Dynamics*. 222:273–279. doi:10.1002/dvdy.1191.
- Tachibana, M., M. Sparman, C. Ramsey, H. Ma, H.-S. Lee, M.C.T. Penedo, and S. Mitalipov. 2012. Generation of Chimeric Rhesus Monkeys. *Cell*. 148:285–295. doi:10.1016/j.cell.2011.12.007.
- Taft, R.A. 2008. Virtues and limitations of the preimplantation mouse embryo as a model system. *Theriogenology*. 69:10–16. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.032.
- Tai, C.-I., and Q.-L. Ying. 2013. Gbx2, a LIF/Stat3 target, promotes reprogramming to and retention of the pluripotent ground state. *J. Cell. Sci.* 126:1093–1098. doi:10.1242/jcs.118273.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka. 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 131:861–872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takahashi, K., and S. Yamanaka. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 126:663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Takahashi, S., S. Kobayashi, and I. Hiratani. 2018. Epigenetic differences between naïve and primed pluripotent stem cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 75:1191–1203. doi:10.1007/s00018-017-2703-x.
- Takashima, Y., G. Guo, R. Loos, J. Nichols, G. Ficuz, F. Krueger, D. Oxley, F. Santos, J. Clarke, W. Mansfield, W. Reik, P. Bertone, and A. Smith. 2014. Resetting Transcription Factor Control Circuitry toward Ground-State Pluripotency in Human. *Cell*. 158:1254–1269. doi:10.1016/j.cell.2014.08.029.
- Tam, P.P.L., and S.X. Zhou. 1996. The Allocation of Epiblast Cells to Ectodermal and Germ-Line Lineages Is Influenced by the Position of the Cells in the Gastrulating Mouse Embryo. *Developmental Biology*. 178:124–132. doi:10.1006/dbio.1996.0203.

- Tan, B.S.N., J. Kwek, C.K.E. Wong, N.J. Saner, C. Yap, F. Felquer, M.B. Morris, D.K. Gardner, P.D. Rathjen, and J. Rathjen. 2016. Src Family Kinases and p38 Mitogen-Activated Protein Kinases Regulate Pluripotent Cell Differentiation in Culture. *PLoS ONE*. 11:e0163244. doi:10.1371/journal.pone.0163244.
- Tanaka, J., Y. Kondo, M. Sakurai, A. Sawada, Y. Hwang, A. Miura, Y. Shimamura, D. Shimizu, Y. Hu, H. Sarmah, Z. Ninish, J. Cai, J. Wu, and M. Mori. 2024. Ephrin Forward Signaling Controls Interspecies Cell Competition in Pluripotent Stem Cells. doi:10.1101/2024.06.02.597057.
- Tapponnier, Y., M. Afanassieff, I. Aksoy, M. Aubry, A. Moulin, L. Medjani, W. Bouchereau, C. Mayère, P. Osteil, J. Nurse-Francis, I. Oikonomakos, T. Joly, L. Jouneau, C. Archilla, B. Schmaltz-Panneau, N. Peynot, H. Barasc, A. Pinton, J. Lecardonnel, E. Gocza, N. Beaujean, V. Duranthon, and P. Savatier. 2017. Reprogramming of rabbit induced pluripotent stem cells toward epiblast and chimeric competency using Krüppel-like factors. *Stem Cell Research*. 24:106–117. doi:10.1016/j.scr.2017.09.001.
- Tarkowski, A.K. 1959. Experiments on the Development of Isolated Blastomeres of Mouse Eggs. *Nature*. 184:1286–1287. doi:10.1038/1841286a0.
- Tarkowski, A.K. 1961. Mouse Chimæras Developed from Fused Eggs. *Nature*. 190:857–860. doi:10.1038/190857a0.
- Tarkowski, A.K., and J. Wróblewska. 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol*. 18:155–180.
- Teixeira, M., L. Commin, L. Gavin-Plagne, P. Bruyère, S. Buff, and T. Joly. 2018. Rapid cooling of rabbit embryos in a synthetic medium. *Cryobiology*. 85:113–119. doi:10.1016/j.cryobiol.2018.07.006.
- Tesar, P.J., J.G. Chenoweth, F.A. Brook, T.J. Davies, E.P. Evans, D.L. Mack, R.L. Gardner, and R.D.G. McKay. 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. 448:196–199. doi:10.1038/nature05972.
- Teslaa, T., and M.A. Teitell. 2015. Pluripotent stem cell energy metabolism: an update. *EMBO J*. 34:138–153. doi:10.15252/embj.201490446.
- Theunissen, T.W., M. Friedli, Y. He, E. Planet, R.C. O’Neil, S. Markoulaki, J. Pontis, H. Wang, A. Iouranova, M. Imbeault, J. Duc, M.A. Cohen, K.J. Wert, R. Castanon, Z. Zhang, Y. Huang, J.R. Nery, J. Drotar, T. Lungjangwa, D. Trono, J.R. Ecker, and R. Jaenisch. 2016. Molecular Criteria for Defining the Naive Human Pluripotent State. *Cell Stem Cell*. 19:502–515. doi:10.1016/j.stem.2016.06.011.

- Theunissen, T.W., B.E. Powell, H. Wang, M. Mitalipova, D.A. Faddah, J. Reddy, Z.P. Fan, D. Maetzel, K. Ganz, L. Shi, T. Lungjangwa, S. Imsoonthornruksa, Y. Stelzer, S. Rangarajan, A. D'Alessio, J. Zhang, Q. Gao, M.M. Dawlaty, R.A. Young, N.S. Gray, and R. Jaenisch. 2014. Systematic Identification of Culture Conditions for Induction and Maintenance of Naive Human Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 15:471–487. doi:10.1016/j.stem.2014.07.002.
- Thiagarajan, R.D., R. Morey, and L.C. Laurent. 2014. The epigenome in pluripotency and differentiation. *Epigenomics*. 6:121–137. doi:10.2217/epi.13.80.
- Thomson, J.A., J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, and J.M. Jones. 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 282:1145–1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145.
- Thomson, J.A., J. Kalishman, T.G. Golos, M. Durning, C.P. Harris, R.A. Becker, and J.P. Hearn. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:7844–7848. doi:10.1073/pnas.92.17.7844.
- Thomson, J.A., J. Kalishman, T.G. Golos, M. Durning, C.P. Harris, and J.P. Hearn. 1996. Pluripotent Cell Lines Derived from Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Blastocysts¹. *Biology of Reproduction*. 55:254–259. doi:10.1095/biolreprod55.2.254.
- Toyooka, Y., D. Shimosato, K. Murakami, K. Takahashi, and H. Niwa. 2008. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development*. 135:909–918. doi:10.1242/dev.017400.
- Tseng, C.-H., K.D. Murray, M.-F. Jou, S.-M. Hsu, H.-J. Cheng, and P.-H. Huang. 2011. Sema3E/Plexin-D1 Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Ovarian Endometrioid Cancer. *PLoS ONE*. 6:e19396. doi:10.1371/journal.pone.0019396.
- Vallier, L., S. Mendjan, S. Brown, Z. Chng, A. Teo, L.E. Smithers, M.W.B. Trotter, C.H.-H. Cho, A. Martinez, P. Rugg-Gunn, G. Brons, and R.A. Pedersen. 2009. Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development*. 136:1339–1349. doi:10.1242/dev.033951.
- Vallot, C., C. Huret, Y. Lesecque, A. Resch, N. Oudrhiri, A. Bennaceur-Griscelli, L. Duret, and C. Rougeulle. 2013. XACT, a long noncoding transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells. *Nat Genet*. 45:239–241. doi:10.1038/ng.2530.

- Vallot, C., C. Patrat, A.J. Collier, C. Huret, M. Casanova, T.M. Liyakat Ali, M. Tosolini, N. Frydman, E. Heard, P.J. Rugg-Gunn, and C. Rougeulle. 2017. XACT Noncoding RNA Competes with XIST in the Control of X Chromosome Activity during Human Early Development. *Cell Stem Cell*. 20:102–111. doi:10.1016/j.stem.2016.10.014.
- Van Den Berg, D.L.C., W. Zhang, A. Yates, E. Engelen, K. Takacs, K. Bezstarosti, J. Demmers, I. Chambers, and R.A. Poot. 2008. Estrogen-Related Receptor Beta Interacts with Oct4 To Positively Regulate Nanog Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology*. 28:5986–5995. doi:10.1128/MCB.00301-08.
- Van Der Jeught, M., B. Heindryckx, T. O’Leary, G. Duggal, S. Ghimire, S. Lierman, N. Van Roy, S.M. Chuva De Sousa Lopes, T. Deroo, D. Deforce, and P. De Sutter. 2014. Treatment of human embryos with the TGF inhibitor SB431542 increases epiblast proliferation and permits successful human embryonic stem cell derivation. *Human Reproduction*. 29:41–48. doi:10.1093/humrep/det400.
- Vassena, R., S. Boué, E. González-Roca, B. Aran, H. Auer, A. Veiga, and J.C.I. Belmonte. 2011. Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development*. 138:3699–3709. doi:10.1242/dev.064741.
- Viebahn, C., C. Stortz, S.A. Mitchell, and M. Blum. 2002. Low proliferative and high migratory activity in the area of Brachyury expressing mesoderm progenitor cells in the gastrulating rabbit embryo. *Development*. 129:2355–2365. doi:10.1242/dev.129.10.2355.
- Wang, M., L. Tang, D. Liu, Q.-L. Ying, and S. Ye. 2017. The transcription factor Gbx2 induces expression of Kruppel-like factor 4 to maintain and induce naïve pluripotency of embryonic stem cells. *Journal of Biological Chemistry*. 292:17121–17128. doi:10.1074/jbc.M117.803254.
- Wang, S., Y. Shen, X. Yuan, K. Chen, X. Guo, Y. Chen, Y. Niu, J. Li, R.-H. Xu, X. Yan, Q. Zhou, and W. Ji. 2008. Dissecting Signaling Pathways That Govern Self-renewal of Rabbit Embryonic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 283:35929–35940. doi:10.1074/jbc.M804091200.
- Wang, S., X. Tang, Y. Niu, H. Chen, B. Li, T. Li, X. Zhang, Z. Hu, Q. Zhou, and W. Ji. 2007. Generation and Characterization of Rabbit Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 25:481–489. doi:10.1634/stemcells.2006-0226.

- Wang, X., T. Li, T. Cui, D. Yu, C. Liu, L. Jiang, G. Feng, L. Wang, R. Fu, X. Zhang, J. Hao, Y. Wang, L. Wang, Q. Zhou, W. Li, and B. Hu. 2018. Human embryonic stem cells contribute to embryonic and extraembryonic lineages in mouse embryos upon inhibition of apoptosis. *Cell Res.* 28:126–129. doi:10.1038/cr.2017.138.
- 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. *Developmental Biology.* 275:192–201. doi:10.1016/j.ydbio.2004.06.026.
- Ware, C.B., L. Wang, B.H. Mecham, L. Shen, A.M. Nelson, M. Bar, D.A. Lamba, D.S. Dauphin, B. Buckingham, B. Askari, R. Lim, M. Tewari, S.M. Gartler, J.-P. Issa, P. Pavlidis, Z. Duan, and C.A. Blau. 2009. Histone Deacetylase Inhibition Elicits an Evolutionarily Conserved Self-Renewal Program in Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 4:359–369. doi:10.1016/j.stem.2009.03.001.
- Wei, X., X. Fang, X. Yu, H. Li, Y. Guo, Y. Qi, C. Sun, D. Han, X. Liu, N. Li, and H. Hu. 2023. Integrative analysis of single-cell embryo data reveals transcriptome signatures for the human pre-implantation inner cell mass. *Developmental Biology.* 502:39–49. doi:10.1016/j.ydbio.2023.07.004.
- Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 81:323–330. doi:10.1016/0092-8674(95)90385-2.
- Wianny, F., A. Bernat, C. Huissoud, G. Marcy, S. Markossian, V. Cortay, P. Giroud, V. Leviel, H. Kennedy, P. Savatier, and C. Dehay. 2008. Derivation and Cloning of a Novel Rhesus Embryonic Stem Cell Line Stably Expressing Tau-Green Fluorescent Protein. *Stem Cells.* 26:1444–1453. doi:10.1634/stemcells.2007-0953.
- Williams, R.L., D.J. Hilton, S. Pease, T.A. Willson, C.L. Stewart, D.P. Gearing, E.F. Wagner, D. Metcalf, N.A. Nicola, and N.M. Gough. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.* 336:684–687. doi:10.1038/336684a0.
- Wray, J., T. Kalkan, S. Gomez-Lopez, D. Eckardt, A. Cook, R. Kemler, and A. Smith. 2011. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat Cell Biol.* 13:838–845. doi:10.1038/ncb2267.
- Wu, J., H.T. Greely, R. Jaenisch, H. Nakauchi, J. Rossant, and J.C.I. Belmonte. 2016. Stem cells and interspecies chimaeras. *Nature.* 540:51–59. doi:10.1038/nature20573.

- Wu, J., A. Platero-Luengo, M. Sakurai, A. Sugawara, M.A. Gil, T. Yamauchi, K. Suzuki, Y.S. Bogliotti, C. Cuello, M. Morales Valencia, D. Okumura, J. Luo, M. Vilariño, I. Parrilla, D.A. Soto, C.A. Martinez, T. Hishida, S. Sánchez-Bautista, M.L. Martinez-Martinez, H. Wang, A. Nohalez, E. Aizawa, P. Martinez-Redondo, A. Ocampo, P. Reddy, J. Roca, E.A. Maga, C.R. Esteban, W.T. Berggren, E. Nuñez Delicado, J. Lajara, I. Guillen, P. Guillen, J.M. Campistol, E.A. Martinez, P.J. Ross, and J.C. Izpisua Belmonte. 2017. Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell*. 168:473-486.e15. doi:10.1016/j.cell.2016.12.036.
- Wunderlich, S., M. Kircher, B. Vieth, A. Haase, S. Merkert, J. Beier, G. Göhring, S. Glage, A. Schambach, E.C. Curnow, S. Pääbo, U. Martin, and W. Enard. 2014. Primate iPS cells as tools for evolutionary analyses. *Stem Cell Research*. 12:622–629. doi:10.1016/j.scr.2014.02.001.
- Xiang, A.P., F.F. Mao, W.-Q. Li, D. Park, B.-F. Ma, T. Wang, T.W. Vallender, E.J. Vallender, L. Zhang, J. Lee, J.A. Waters, X.-M. Zhang, X.-B. Yu, S.-N. Li, and B.T. Lahn. 2008. Extensive contribution of embryonic stem cells to the development of an evolutionarily divergent host. *Human Molecular Genetics*. 17:27–37. doi:10.1093/hmg/ddm282.
- Xu, R., C. Li, X. Liu, and S. Gao. 2021. Insights into epigenetic patterns in mammalian early embryos. *Protein Cell*. 12:7–28. doi:10.1007/s13238-020-00757-z.
- Yamaguchi, T., H. Sato, T. Kobayashi, M. Kato-itoh, T. Goto, H. Hara, N. Mizuno, A. Yanagida, A. Umino, S. Hamanaka, F. Suchy, H. Masaki, Y. Ota, M. Hirabayashi, and H. Nakauchi. 2018. An interspecies barrier to tetraploid complementation and chimera formation. *Sci Rep*. 8:15289. doi:10.1038/s41598-018-33690-7.
- Yamanaka, Y., F. Lanner, and J. Rossant. 2010. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development*. 137:715–724. doi:10.1242/dev.043471.
- Yang, J., D.J. Ryan, W. Wang, J.C.-H. Tsang, G. Lan, H. Masaki, X. Gao, L. Antunes, Y. Yu, Z. Zhu, J. Wang, A.A. Kolodziejczyk, L.S. Campos, C. Wang, F. Yang, Z. Zhong, B. Fu, M.A. Eckersley-Maslin, M. Woods, Y. Tanaka, X. Chen, A.C. Wilkinson, J. Bussell, J. White, R. Ramirez-Solis, W. Reik, B. Göttgens, S.A. Teichmann, P.P.L. Tam, H. Nakauchi, X. Zou, L. Lu, and P. Liu. 2017a. Establishment of mouse expanded potential stem cells. *Nature*. 550:393–397. doi:10.1038/nature24052.
- Yang, J., A.L. Van Oosten, T.W. Theunissen, G. Guo, J.C.R. Silva, and A. Smith. 2010. Stat3 Activation Is Limiting for Reprogramming to Ground State Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 7:319–328. doi:10.1016/j.stem.2010.06.022.

- Yang, X., and R.H. Foote. 1988. Production of chimeric rabbits from morulae by a simple procedure. *Gamete Research*. 21:345–351. doi:10.1002/mrd.1120210403.
- Yang, Y., B. Liu, J. Xu, J. Wang, J. Wu, C. Shi, Y. Xu, J. Dong, C. Wang, W. Lai, J. Zhu, L. Xiong, D. Zhu, X. Li, W. Yang, T. Yamauchi, A. Sugawara, Z. Li, F. Sun, X. Li, C. Li, A. He, Y. Du, T. Wang, C. Zhao, H. Li, X. Chi, H. Zhang, Y. Liu, C. Li, S. Duo, M. Yin, H. Shen, J.C.I. Belmonte, and H. Deng. 2017b. Derivation of Pluripotent Stem Cells with In Vivo Embryonic and Extraembryonic Potency. *Cell*. 169:243-257.e25. doi:10.1016/j.cell.2017.02.005.
- Yao, K., M.O. Ki, H. Chen, Y.-Y. Cho, S.-H. Kim, D.H. Yu, S.-Y. Lee, K.-Y. Lee, K. Bae, C. Peng, D.Y. Lim, A.M. Bode, and Z. Dong. 2014. JNK1 and 2 play a negative role in reprogramming to pluripotent stem cells by suppressing Klf4 activity. *Stem Cell Research*. 12:139–152. doi:10.1016/j.scr.2013.10.005.
- Yeo, J.-C., J. Jiang, Z.-Y. Tan, G.-R. Yim, J.-H. Ng, J. Göke, P. Kraus, H. Liang, K.A.U. Gonzales, H.-C. Chong, C.-P. Tan, Y.-S. Lim, N.-S. Tan, T. Lufkin, and H.-H. Ng. 2014. Klf2 Is an Essential Factor that Sustains Ground State Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 14:864–872. doi:10.1016/j.stem.2014.04.015.
- Yeom, Y.I., G. Fuhrmann, C.E. Ovitt, A. Brehm, K. Ohbo, M. Gross, K. Hübner, and H.R. Schöler. 1996. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*. 122:881–894. doi:10.1242/dev.122.3.881.
- Ying, Q.L., J. Nichols, I. Chambers, and A. Smith. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*. 115:281–292. doi:10.1016/s0092-8674(03)00847-x.
- Ying, Q.-L., J. Wray, J. Nichols, L. Batlle-Morera, B. Doble, J. Woodgett, P. Cohen, and A. Smith. 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 453:519–523. doi:10.1038/nature06968.
- Yoshida, K., I. Chambers, J. Nichols, A. Smith, M. Saito, K. Yasukawa, M. Shoyab, T. Taga, and T. Kishimoto. 1994. Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. *Mech. Dev.* 45:163–171. doi:10.1016/0925-4773(94)90030-2.
- Yu, J.S.L., and W. Cui. 2016. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*. 143:3050–3060. doi:10.1242/dev.137075.

- Yu, L., Y. Wei, H.-X. Sun, A.K. Mahdi, C.A. Pinzon Arteaga, M. Sakurai, D.A. Schmitz, C. Zheng, E.D. Ballard, J. Li, N. Tanaka, A. Kohara, D. Okamura, A.A. Mutto, Y. Gu, P.J. Ross, and J. Wu. 2021. Derivation of Intermediate Pluripotent Stem Cells Amenable to Primordial Germ Cell Specification. *Cell Stem Cell*. 28:550-567.e12. doi:10.1016/j.stem.2020.11.003.
- Yu, Y., X. Wang, X. Zhang, Y. Zhai, X. Lu, H. Ma, K. Zhu, T. Zhao, J. Jiao, Z.-A. Zhao, and L. Li. 2018. ERK inhibition promotes neuroectodermal precursor commitment by blocking self-renewal and primitive streak formation of the epiblast. *Stem Cell Res Ther*. 9:2. doi:10.1186/s13287-017-0750-8.
- Zanconato, F., M. Cordenonsi, and S. Piccolo. 2016. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell*. 29:783–803. doi:10.1016/j.ccell.2016.05.005.
- Zeilmaker, G.H. 1973. Fusion of Rat and Mouse Morulae and Formation of Chimaeric Blastocysts. *Nature*. 242:115–116. doi:10.1038/242115a0.
- Zhang, H., J.P. Stallock, J.C. Ng, C. Reinhard, and T.P. Neufeld. 2000. Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev*. 14:2712–2724. doi:10.1101/gad.835000.
- Zheng, C., Y. Hu, M. Sakurai, C.A. Pinzon-Arteaga, J. Li, Y. Wei, D. Okamura, B. Ravaux, H.R. Barlow, L. Yu, H.-X. Sun, E.H. Chen, Y. Gu, and J. Wu. 2021. Cell competition constitutes a barrier for interspecies chimerism. *Nature*. 592:272–276. doi:10.1038/s41586-021-03273-0.
- Zhong, B., G.D. Trobridge, X. Zhang, K.L. Watts, A. Ramakrishnan, M. Wohlfahrt, J.E. Adair, and H.-P. Kiem. 2011. Efficient Generation of Nonhuman Primate Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development*. 20:795–807. doi:10.1089/scd.2010.0343.
- Zhou, W., M. Choi, D. Margineantu, L. Margaretha, J. Hesson, C. Cavanaugh, C.A. Blau, M.S. Horwitz, D. Hockenbery, C. Ware, and H. Ruohola-Baker. 2012. HIF1 α induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition: Metabolic switch in ESC-to-EpiSC/hESC transition. *The EMBO Journal*. 31:2103–2116. doi:10.1038/emboj.2012.71.
- Zhu, M., M. Shahbazi, A. Martin, C. Zhang, B. Sozen, M. Borsos, R.S. Mandelbaum, R.J. Paulson, M.A. Mole, M. Esbert, S. Titus, R.T. Scott, A. Campbell, S. Fishel, V. Gradinaru, H. Zhao, K. Wu, Z.-J. Chen, E. Seli, M.J. De Los Santos, and M. Zernicka Goetz. 2021. Human embryo polarization requires PLC signaling to mediate trophectoderm specification. *eLife*. 10:e65068. doi:10.7554/eLife.65068.

Zimmerlin, L., T.S. Park, J.S. Huo, K. Verma, S.R. Pather, C.C. Talbot, J. Agarwal, D. Steppan, Y.W. Zhang, M. Considine, H. Guo, X. Zhong, C. Gutierrez, L. Cope, M.V. Canto-Soler, A.D. Friedman, S.B. Baylin, and E.T. Zambidis. 2016. Tankyrase inhibition promotes a stable human naïve pluripotent state with improved functionality. *Development*. dev.138982. doi:10.1242/dev.138982.

Zimmerlin, L., and E.T. Zambidis. 2020. Pleiotropic roles of tankyrase/PARP proteins in the establishment and maintenance of human naïve pluripotency. *Experimental Cell Research*. 390:111935. doi:10.1016/j.yexcr.2020.111935.

Żylicz, J.J., A. Bousard, K. Žumer, F. Dossin, E. Mohammad, S.T. Da Rocha, B. Schwalb, L. Syx, F. Dingli, D. Loew, P. Cramer, and E. Heard. 2019. The Implication of Early Chromatin Changes in X Chromosome Inactivation. *Cell*. 176:182-197.e23. doi:10.1016/j.cell.2018.11.041.

*

* *

Annexes

I. Données supplémentaires

Tableau S1 - Compétence chimérique intra-espèce des PSC de souris

PSC (état de pluripotence)	Stade de l'embryon hôte	Chimères pré-implantatoires	Chimères fœtales	Chimères à la naissance	Références
mESC LIF/FCS (naïf)	blastocyste	-	-	68% (40/59 petits)	(Tesar et al., 2007)
	8-cellules	-	-	75% (9/12 petits)	(Huang et al., 2008)
		89% (16/18 blastocystes tardifs)	-	-	-
mESC 2i/LIF (naïf)	blastocyste	85% (103/121 blastocystes tardifs)	-	73% (24/33 petits)	(Masaki et al., 2015)
		-	-	77% (20/26 adultes)	(Yu et al., 2021)
	morula	-	-	65% (36/55 petits)	(Ying et al., 2008)
	8-cellules	100% (28/28 blastocystes tardifs)	-	-	(Alexandrova et al., 2015)
iPSC (naïf)	blastocyste	-	-	63% (71/113 petits)	(Masaki et al., 2015)
EpiSC (amorcé)	blastocyste	0% (0/162 blastocystes tardifs)	-	-	(Masaki et al., 2015)
		-	0% (0/95 fœtus E10)	-	(Kinoshita et al., 2021)
		-	-	0% (0/35 petits)	Tesar et al., 2007)
		-	-	1% (2/285 petits)	(Brons et al., 2007)
FS (formatif)	blastocyste	-	31% (26/85 fœtus E9.5)	-	(Kinoshita et al., 2021)
FTW-PSC (formatif)	blastocyste	-	53% (30/57 fœtus)	59% (26/44 adultes)	Yu et al., 2021)
EPSC	morula	-	56% (125/225 embryons E6.5)	-	(Yang et al., 2017a)
EPS-LCDM	8-cellules	60% (157/261 blastocystes)	-	52% (59/113 petits)	(Yang et al., 2017b)

Tableau S2 - Compétence chimérique intra-espèce des PSC de lapin

PSC (état de pluripotence)	Stade de l'embryon hôte	Chimères pré-implantatoires	Chimères fœtales	Chimères à la naissance	Références
rbESC (amorcé)	blastocyste ou 8-cellules	-	-	0% (0/17 petits)	(Honda et al., 2008)
	8-cellules	0% (0/16 blastocystes)	-	-	(Osteil et al., 2013)
		0% (0/74 blastocystes)	-	-	(Osteil et al., 2016)
rbiSC (amorcé)	8-cellules	2% (1/47 blastocystes)	-	-	(Osteil et al., 2013)
		0% (0/27 blastocystes)	-	-	(Tapponnier et al., 2017)
rbEKA (amorcé)	8-cellules	10% (57/547 blastocystes)	3% (2/59 fœtus à E10)	-	(Tapponnier et al., 2017)

Tableau S3 - Compétence chimérique inter-espèce des PSC de primate

PSC (état de pluripotence)	Stade de l'embryon hôte (espèce)	Chimères -implantatoires	Chimères fœtales	Contribution à l'embryon hôte	Références
hESC NHSM (pseudo-naïf)	morula (souris)	-	6% (13/210 fœtus E8.5-E10.5)	-	(Gafni et al., 2013)
		-	0% (0/195 fœtus E10.5)	-	(Theunissen et al., 2014)
		-	0% (0/119 fœtus E9.5-12.5)	-	(Theunissen et al., 2016)
hiPSC NHSM (pseudo-naïf)	blastocyste (porc)	43% (19/44 blastocystes tardifs)	20% (5/25 fœtus normaux)	Faible	(Wu et al., 2017)
hESC 5i/L/A (pseudo-naïf)	morula (souris)	-	0% (0/368 fœtus E10.5)	-	(Theunissen et al., 2014)
		-	0% (0/108 fœtus E9.5-E12.5)	-	(Theunissen et al., 2016)
	blastocyste (souris)	-	3% (1/31 fœtus E9.5-E12.5)	-	(Theunissen et al., 2016)
hiPSC 5i/L/A (pseudo-naïf)	blastocyste (souris)	-	0% (0/66 fœtus E10.5)	-	(Huang et al., 2018)
hESC reset (pseudo-naïf)	morula (souris)	-	0% (0/94 fœtus E9.5-E12.5)	-	(Theunissen et al., 2016)
	blastocyste (souris)	-	0% (0/150 fœtus E9.5-E12.5)	-	(Theunissen et al., 2016)
hiPSC reset (pseudo-naïf)	morula (souris)	16% (8/49 blastocyste)	-	-	(Takashima et al., 2014)
	blastocyste (souris)	28% (9/32 blastocystes tardifs)	-	-	(Takashima et al., 2014)
		9% (11/121 blastocystes tardifs)	-	-	(Masaki et al., 2015)
		-	4% (3/73 fœtus E10.5)	-	(Huang et al., 2018)
	blastocyste (porc)	37% (11/30 blastocystes tardifs)	23% (3/13 fœtus normaux)	Faible	(Wu et al., 2017)
hiPSC HENSM (pseudo-naïf)	morula (souris)	-	3% (fœtus E9.5-E10.5)	Faible (1-2% cellules dérivées des PSC injectées)	(Bayerl et al., 2021)
hESC 4CL (pseudo-naïf)	8-cellules (souris)	93% (31/33 blastocystes)	15% (7/48 fœtus E10.5)	-	(Mazid et al., 2022)
hiPSC t2iLGö (pseudo-naïf)	morula (lapin)	28% (97/350 blastocystes tardifs)	-	Faible (3 cellules dérivées des PSC injectées)	(Aksoy et al., 2021)

	morula (cynomolgus)	13% (2/15 blastocystes)	-	Faible (3 cellules dérivées des PSC injectées)	(Aksoy et al., 2021)
hiPSC TL2i (pseudo-naïf)	morula (lapin)	25% (75/298 blastocystes tardifs)	-	Faible (3 cellules dérivées des PSC injectées)	(Aksoy et al., 2021)
	morula (cynomolgus)	29% (2/7 blastocystes)	-	Faible (7 cellules dérivées des PSC injectées)	(Aksoy et al., 2021)
rhesus ESC TL2i (pseudo-naïf)	morula (lapin)	39% (79/204 blastocystes tardifs)	0% (0/19 fœtus E9)	Faible	(Aksoy et al., 2021)
	morula (cynomolgus)	29% (2/7 blastocystes)	-	Faible (2 cellules dérivées des PSC injectées)	(Aksoy et al., 2021)
hPSC FTW (formatif)	blastocyste (porc)	31% (10/32 blastocystes tardifs)	15% (7/47 fœtus normaux)	Faible	(Wu et al., 2017)
hiPSC conventionnelles (amorcé)	morula (souris)	0% (0/37 blastocystes)	-	-	(Takashima et al., 2014)
	blastocyste (souris)	0% (0/17 blastocystes tardifs)	-	-	(Takashima et al., 2014)
	blastocyste (souris)	9% (30/345 blastocystes tardifs)	-	-	(Masaki et al., 2015)
	blastocyste (souris)	-	0% (0/36 fœtus E10.5)	-	(Huang et al., 2018)
	gastrula E6.5-E7.5 (souris)	-	81%	-	(Mascetti and Pedersen, 2016)
	blastocyste (porc)	0% (0/26 blastocystes tardifs)	-	-	(Wu et al., 2017)
hESC conventionnelles (amorcé)	8-cellules (souris)	0% (0/61 blastocystes)	0% (0/18 fœtus E10.5)	-	(Mazid et al., 2022)
	blastocyste (souris)	-	0% (0/21 fœtus E10.5)	-	(Huang et al., 2018)
	gastrula E6.5-E7.5 (souris)	-	99%	-	(Mascetti and Pedersen, 2016)
rhesus iPSC conventionnelles (amorcé)	blastocyste (souris)	-	0% (0/50 fœtus E10.5)	-	(Fang et al., 2014)
rhesus ESC conventionnelles (amorcé)	blastocyste (souris)	-	0% (0/58 fœtus E12)	-	(Simerly et al., 2011)
rhesus ESC conventionnelles (amorcé)	morula (lapin)	0% (0/90 blastocystes tardifs)	-	-	(Aksoy et al., 2021)

II. Article 1

Perold, Pham, Pijoff *et al.* A Cocktail of Genes and Growth Factors Promotes the Generation of Chimeric Fetuses and Newborns with Induced Pluripotent Stem Cells in Rabbits, preprint biorxiv, 2024, DOI: 10.1101/2024.01.10.575048 (Perold et al., 2024)

En révision chez **Nature Communications**.

Viable chimeric rabbits with a high contribution of induced pluripotent stem cells

Florence Perold^{1,§}, Hong-Thu Pham^{1,§}, Yannicke Pijoff^{1,§}, Nathalie Doerflinger¹, Sylvie RivalGervier¹, Florence Wianny¹, Anaïs Moulin¹, Manon Ressaire¹, Emilie Da Silva Fernandes¹, Luc Jouneau^{2,3}, Bertrand Pain¹, Thierry Joly^{4,5}, Véronique Duranthon^{2,3}, Marielle Afanassieff^{1,£,*}, Pierre Savatier^{1,£,*}, Nathalie Beaujean^{1,£,*}

- ¹ Univ Lyon, Université Lyon 1, INSERM, Stem Cell and Brain Research Institute U1208, INRAE USC 1361, F-69500 Bron, France
- ² Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, 78350, Jouy-en-Josas, France
- ³ Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, 94700, Maisons-Alfort, France
- ⁴ ISARA-Lyon, F-69007 Lyon, France
- ⁵ VetAgroSup, UPSP ICE, F-69280 Marcy l'Etoile, France

Footnotes

[§] These authors have equally contributed to this work and are listed by alphabetical order.

[£] Co-senior authors

***Corresponding authors**

P.S. (pierre.savatier@inserm.fr)

N.B. (nathalie.beaujean@inserm.fr)

M.A. (marielle.afanassieff@inserm.fr)

Summary

Viable systemic chimeras with pluripotent stem cells have never been achieved in non-rodent species. To overcome this hurdle, we used rabbits as a model system. We conducted an unbiased screening of a cDNA library encoding a panel of 36 pluripotency factors and identified KLF2, ERAS, and PRMT6. The expression of these factors enables rabbit induced pluripotent stem cells to self-renew in a culture medium free of FGF2 and supplemented with LIF, activin A, PKC and WNT inhibitors. The reprogrammed cells acquired the transcriptomic, epigenetic, and functional features of naive pluripotency, including the ability to colonize the epiblast in host embryos. Remarkably, using a subset of reprogrammed cells expressing CD75 at a high level, we produced chimeric fetuses and newborns with a high contribution from induced pluripotent stem cells in all major organs. Additionally, we successfully generated chimeric male and female young rabbits. These results provide the first demonstration of viable chimeras in a non-rodent species, paving the way for the generation of new disease models with complex genetic traits.

Introduction

Systemic chimerism, also referred to as germline chimerism in mice, is the ability of embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) to contribute to the formation of all tissues and organs in both the fetus and the adult organism following their injection into blastocysts or aggregation with morulae. To date, germline chimerism has been documented exclusively in rodents, and is regarded as the definitive test for pluripotency, providing incontrovertible evidence that ESCs and iPSCs can generate fully functional cells in every organ and tissue^{1,2}. It is generally accepted that only ESCs and iPSCs in the naïve state of pluripotency can colonize preimplantation embryos and subsequently differentiate into all somatic and germline lineages³. In mice, pluripotent cells that self-renew in the primed state of pluripotency, known as EpiSCs^{4,5}, cannot contribute to chimeras after introduction into preimplantation embryos unless they are genetically engineered to express a high level of Ecadherin or BCL2^{3,6,7}. Pluripotent cells with a capacity to contribute to both fetal and extraembryonic lineages, including trophoctoderm and primitive endoderm, have also been reported in mice. They are referred to as 2C-like cells (2CLCs)⁸, expanded pluripotent stem cells (EPSCs)⁹, totipotent-like stem cells (TLSCs)¹⁰, totipotent blastomere-like cells (TBLCs)¹¹, and chemically-induced totipotent stem cells (ciTotiSCs)¹².

The development of germline chimera technology in non-human primates, artiodactyls, and lagomorphs is eagerly awaited as it will pave the way for the generation of

new models for human diseases¹³⁻¹⁷. In cynomolgus monkeys, Chen and colleagues reported two chimeric fetuses with widespread colonization by ESC-derived cells¹⁸. Sporadic ESC-derived VASA⁺ cells were detected in the testes, suggesting germline colonization. However, the rate of chimerism was low and highly variable between tissues and organs. Cao and colleagues made a groundbreaking contribution by reporting two cynomolgus monkey newborns with significant contribution of ESCs, ranging from 20 to 90% in different organs, including VASA⁺ germ-cells¹⁹. However, of these two newborns, one was stillborn, and the other had severe pathologies. In pigs, 27-day chimeric fetuses were reported after the injection of EPSCs into blastocysts²⁰. In rabbits, 10-day chimeric conceptuses were obtained following the injection of iPSCs into morulae. However, the rate of chimerism was recognized as very low (*i.e.*, less than one iPSC-derived cell in 1,000)²¹.

In this study, we conducted unbiased screenings of a cDNA library encoding a panel of 36 pluripotency factors. From this, we identified genes whose overexpression in rabbit iPSCs endows the ability to produce chimeric embryos, fetuses, and newborns with high contributions from PSCs in all major organs. Finally, we characterized the transcriptomic signature of chimeric competent iPSCs and identified some candidate regulatory mechanisms, which underpin massive embryo colonization.

Results

Development of a novel culture regimen and a reporter cell line for naïve pluripotency in rabbits.

Rabbit iPSCs (rbiPSCs, B19 cell line) are commonly cultured in basal medium supplemented with FGF2 and knockout serum replacement (KOSR) factors, or KF medium (referred to as B19_KF^{21,22}). When attempts were made to grow B19_KF cells in media originally described for naïve human and rhesus monkey ESCs/iPSCs (*i.e.* ENHSM²³, 5iLA²⁴, t2iLGÖY²⁵, 4i/L/b²⁶, and LCDM²⁷), the cells either died or differentiated (**Fig. S1a**). However, when cultured in murine embryonic fibroblast (MEF)-conditioned N2B27 basal media supplemented with 10 ng/ml activin A, 10,000 U/ml LIF, 250µM vitamin C, 2.5µM protein kinase C inhibitor Gö6983, and 2.5µM tankyrase inhibitor XAV939 (hereafter called VALGÖX), B19 cells displayed progressive morphological and molecular changes. After 48h in VALGÖX (referred to as B19_VAL), they formed more compact colonies (**Fig. 1a, 1b**). Immunofluorescence analysis also revealed higher expression of two naïve markers, DPPA5 and OOEP²⁸, increased levels of the permissive histone mark H3K14ac, decreased levels of the repressive histone marks H3K9me3 and H3K27me3, and decreased levels of 5-methyl-Cytosine (5mC), suggesting the onset of a transition from primed to naïve-like pluripotency (**Fig. 1b**). Moreover, transcriptome analysis showed reduced expression of rabbit primed and gastrulation markers and increased

expression of rabbit formative markers²⁸ (**Fig. 1c**). However, B19_VAL cells lacked certain key characteristics of naïve PSCs. Specifically, immunostaining for H2AK119ub and H3K27me3, two histone post-translational modifications associated with X chromosome inactivation in mice and humans²⁹, exhibited nuclear foci in 69% (H2AK119ub) and 80% (H3K27me3) of B19_VAL cells, and in 78% (H2AK119ub) and 75% (H3K27me3) of B19_KF cells (**Figs. S1b, S1c**). This suggests the presence of an inactive X chromosome, typical of primed PSCs, in the majority of both B19_KF and B19_VAL cells. The ability of B19_KF and B19_VAL cells to colonize rabbit preimplantation embryos was examined. Both B19_VAL and B19_KF cells demonstrated limited capacity for epiblast contribution after injection into early morula stage embryos (E2.8) (**Fig. S1d**). In summary, these findings suggest that the VALGöX culture regimen promotes the development of rabbit iPSCs towards a more immature pluripotent state, but does not achieve genuine naïve-state reprogramming. After 14 days in VALGöX, B19_VAL_14d cells exhibited morphological differentiation (**Fig. 1d**). Transcriptomic analysis revealed a decline in the expression of naïve, formative, and primed pluripotency markers, alongside an up-regulation of lineage markers, confirming the initiation of differentiation (**Fig. 1e**). The VALGöX culture regimen therefore fails to support B19 cell self-renewal.

To monitor the transition from primed to naïve pluripotent states and to identify rare cells undergoing this conversion in B19 cell cultures, we developed a dual fluorescent naïve pluripotency reporter. *DPPA2* was selected as a marker of naïve pluripotency in rabbits, based on its expression profile in pre-implantation embryos. Single-cell RNAseq analyses indicated that *DPPA2* is expressed in all pluripotent cells of day 3 (early-blastocyst stage) and day 4 (midblastocyst stage) rabbit embryos, with expression decreasing from day 5 onwards, suggesting down-regulation during the transition from naïve to primed pluripotency (**Fig. S1e**)²⁸. B19 cells expressing the GFP were transfected with a Dox-inducible Cas9D10A, gRNAs targeting the rabbit *DPPA2* locus, and a plasmid carrying monomeric Kusabira Orange (*mKO2*) with *DPPA2* homology sequences. This homology-directed repair strategy aimed to integrate *mKO2* downstream of the ATG codon of *DPPA2* (**Fig. S1f**). After selection with G418 and genomic PCR analysis, one cell clone was further transfected with *pEOS^{tagBFP}*, a reporter plasmid containing blue fluorescent protein (tagBFP) under the naïve-specific distal enhancer of mouse *Pou5f1/Oct4*³⁰ (**Fig. S1g**). A clone named NaiveRep was selected, containing both *DPPA2^{mKO2}* and *EOS^{TagBFP}*. NaiveRep exists in two forms: NaiveRep_KF cells and NaiveRep_VAL, the latter obtained after culturing NaiveRep_KF cells in VALGöX medium for 48 h (**Fig. 1f**). Interestingly, NaiveRep_VAL cells expressed the fluorescent reporter EOS-TagBFP at a slightly higher level than NaiveRep_KF cells. In contrast, no difference in *mKO2* fluorescence level was observed between the two cell types (**Fig. 1g**). Overall, these findings confirm the VALGöX culture medium's capacity to initiate conversion to naïve pluripotency but also highlight its inability to complete the process.

cDNA library screening

A library of 25 human cDNAs was generated using the W10 simian immunodeficiency virus (SIV)-based backbone lentiviral vector³¹. The selected cDNAs encode transcriptional factors (*NANOG*, *SOX2*, *KLF2*, *KLF4*, *KLF5*, *KLF12*, *ESRRB*, *ESRRG*, *GBX2*, *TFCP2L1*, *NR5A2*, *SALL4*, *MYC*, and *GFI1*), a signaling molecule (ERAS), histone modifying enzymes, and chromatin modifiers (*PRMT6*, *KHDC1*, *KAT2B*, *KDM4D*, *SUV39H1*, *BMI1*, and *GASC1*), a cell-cycle protein (*CCNE1*), and viral oncogenes, including SV40 Large T antigen (AgT) and adenovirus E1A-12S. Many of these selected genes have been demonstrated to support naïve pluripotency or facilitate the resetting to naïve-like features when overexpressed in mice and humans^{25,32-50}. Our RNAseq analyses of rabbit embryos confirmed that all but one gene (*GFI1*) were expressed in the ICM/early epiblast of day 3 and 4 rabbit blastocysts²⁸ (**Fig. S2a**). The relative titers of the 25 viruses were estimated by serial dilution (**Fig. S2b**). To test the ability of B19 cells to be infected with several lentiviruses simultaneously, we used four W10 lentiviral vectors expressing GFP, mKO2, tagBFP, and Katushka, respectively, which showed that up to 70% of the transduced cells could be infected by the four vectors at a multiplicity of infection (MOI) of 50 (**Figs. S2c, S2d**).

A total of 2.4×10^5 NaiveRep cells were transduced with the cDNA library using a MOI of 50, and subsequently cultured for seven days (**Fig. 2a**). Nearly 5,000 colonies were examined under epifluorescence, and 27 exhibiting increased mKO2- and/or tagBFP-associated fluorescence were selected and amplified for further analysis (subsequently termed NaiveRep_KF clones). Flow cytometry analysis of tagBFP and mKO2 fluorescence revealed significant variations in the percentage of positive cells, ranging from 1% to 80% (tagBFP) and from 1% to 7% (mKO2) (**Fig. 2b**). Analysis of the genomic DNA of the 27 clones by PCR revealed an average of 9.3 ± 3.6 different provirus integrations per clone (**Fig. 2c**). The most frequently observed proviral DNAs included *ESRRG* (24 clones), *ERAS* (23 clones), *KLF2* (22 clones), *BMI1* (18 clones), *PRMT6* (17 clones), *NANOG* (16 clones), *ESRRB* (16 clones), and *AgT* (15 clones). Out of 63 possible combinations of three different proviruses among the eight most frequent, seven were observed in more than 50% of the 27 clones analyzed: *KLF2/ERAS/ESRRB* (14/27); *KLF2/ERAS/BMI1* (14/27); *ERAS/ESRRG/PRMT6* (14/27), *ERAS/ESRRB/ESRRG* (13/27); *ERAS/ESRRG/BMI1* (14/27); *KLF2/ERAS/PRMT6* (15/27); and *KLF2/ERAS/ESRRG* (17/27). Notably, among the six clones (#8, #15, #17, #19, #22, and #26, respectively) with more than 30% of cells expressing tagBFP, four clones (#8, #15, #22, and #26) harbored cDNAs for *KLF2*, *ERAS*, *ESRRG*, and *PRMT6*; one clone (#17) harbored *KLF2*, *ERAS*, and *ESRRG*; and one clone (#19) harbored *ERAS* and *ESRRG*. In summary, the screening identified a combination of four provirus (*KLF2*, *ERAS*, *ESRRG*, and *PRMT6*) that most frequently occurred among EOS-tagBFP-induced clones.

In the second screening experiment, 2.4×10^5 NaiveRep cells were transduced with an updated cDNA library containing 11 additional human cDNAs (*SMAD7*, *DPPA2*, *DPPA4*, *DPPA5*, *KLF17*, *TBX3*, *DAX1*, *TRIM8*, *USP21*, *TFAP2C*, and *OOEP*). The MOI was reduced to 15 viruses

per cell (approximately 0.4 virus per cDNA per cell) to decrease the average number of cDNAs per clone, thus increasing screening stringency. The transduced cell population was shifted from FGF2/KSR to either fetal calf serum (FCS) + LIF (screen 2a) or KOSR + LIF (screen 2b) (**Fig. 2a**). In these two culture conditions, unmodified NaiveRep cells were unable to self-renew and differentiated. Approximately 5,000 colonies were examined under epifluorescence, with 14 colonies (screen 2a; **Fig. 2d**) and three colonies (screen 2b; **Fig. 2e**) exhibiting tagBFP- and/or mKO2-associated fluorescence. These colonies were selected and amplified. The average number of proviral integrations was 4.8 +/- 2.4. The most frequently observed proviral integrations were *GBX2* (10/17 clones), *PRMT6* (9/17 clones), *SALL4* (8/17 clones), and *ESRRB* (7/10 clones) (**Fig. 2f**). No specific combination of proviral integrations could be identified in screens 2a and 2b.

In the third screening experiment, 2.4×10^5 NaiveRep cells were transduced with the extended cDNA library using a MOI of 15. After 24 hours, the cells were transferred from FGF2/KSR to VALGöX culture medium and cultured for an additional 7 days (**Fig. 2a**). Almost 9,000 colonies were examined under epifluorescence, and 32 displayed strong tagBFP- and mKO2-associated fluorescence. These colonies were selected and amplified for further analysis, later termed NaiveRep_VALGöX clones. In these 32 cell clones, the percentage of fluorescent cells ranged from 1% to 71% (tagBFP) and from 1% to 64% (mKO2) (**Fig. 2g**). Of these, 21 were analyzed for proviral integrations, with an average of 4.8 +/- 2.0 integrations per clone. The most frequently observed proviral integrations were *ERAS* (16 of 21 clones) and *PRMT6* (15 of 21 clones) (**Fig. 2h**). Notably, all clones exhibiting high $\text{EOS}^{\text{tagBFP}}$ and $\text{DPPA2}^{\text{mKO2}}$ expression contained the *KLF2* provirus (clones #1, #12, #14, #16, and #25), and all but one (clone #16) also harbored the *ERAS* and *PRMT6* proviruses. Consequently, this screen identified a combination of three proviruses (*KLF2*, *ERAS* and *PRMT6*) in clones exhibiting higher expression of both $\text{EOS}^{\text{tagBFP}}$ and $\text{DPPA2}^{\text{mKO2}}$ naïve markers.

Four cell lines that displayed activation of both fluorescent reporters in the VALGöX culture condition (NaiveRep_VALGöX#1, NaiveRep_VALGöX#14, NaiveRep_VALGöX #16, and NaiveRep_VALGöX#25; **Figs 2g, S2e**) were selected for further analysis. All four cell lines exhibited consistent growth for at least six passages (**Fig. S2f**). Immunofluorescence analysis of histone marks H3K27me3 and H2AK119Ub showed a reduction in the percentage of cells with nuclear foci, suggesting the reactivation of the second X chromosome in some cells (H2AK119Ub: 48%, 35%, 11%, and 5% in #1, #14, #16, and #25, respectively, compared with 63% in control NaiveRep cells; H3K27me3: 38%, 19%, and 17% in #14, #16, and #25, respectively, compared with 76% in control NaiveRep cells; **Figs. 2i, 2j**). Notably, a negative correlation was observed between the percentage of $\text{EOS}^{\text{tagBFP}}$ -positive cells and the percentage of cells harboring a nuclear foci H3K27me3 and H2AK119Ub (**Fig. S2g**), further supporting the naïve-like epigenetic characteristics of the fluorescent cell population.

Stabilization of iPSCs in a naïve-like pluripotent state using a KLF2/ERAS/PRMT6 gene cocktail

To investigate the role of KLF2 (K), ERAS (E), and PRMT6 (P) individually or in combinations in restoring naïve pluripotency characteristics in rabbit iPSCs, B19 were transfected with plasmids expressing V5-tagged KLF2 and neoR (*pKLF2:V5-neo*), HA-tagged ERAS and hygRO (*pHA:ERAS-hygro*), and Flag-tagged PRMT6 and puroR (*pFlag:PRMT6-puro*), respectively. Following selection with single, double, and triple antibiotics in VALGÖX medium, resistant colonies were pooled and propagated for 10 passages before phenotypic analysis (**Fig. S3a**). Similar to control B19_VAL cells, B19_VAL cells expressing *HA:ERAS* and *Flag:PRMT6* transgenes individually or in combination (referred to as E, P, and EP, respectively), gradually differentiated between passage 5 (P5) and P10 (**Fig. 3a, S3b**). In contrast, B19_VAL cells expressing *KLF2:V5* alone or with *HA:ERAS*, and *Flag:PRMT6* (K, KE, KP, and KEP, respectively) maintained self-renewal without visible differentiation, highlighting KLF2's crucial role in long-term self-renewal in VALGÖX. Interestingly, cells expressing the three transgenes (KEP) showed higher expression of the naïve pluripotency cell surface marker CD75^{51,52} compared to K, KE, and KP configurations (**Fig. 3a, 3b**). Furthermore, KEP cells exhibited fewer cells with nuclear foci after immunostaining for H3K27me3 and H2AK119Ub, suggesting higher rate of X chromosome reactivation when *KLF2:V5*, *HA:ERAS*, and *Flag:PRMT6* are co-expressed (**Fig. 3a, 3c**). Double immunostaining of CD75 and H3K27me3 revealed a strong correlation between CD75 expression and the reactivation of the second X chromosome (**Fig. 3d**).

Further investigation into the synergistic effect of the KEP transgenes and the VALGÖX culture regimen involved transfecting B19 cells cultured in KF with *pKLF2:V5-neo*, *pHA:ERAS-hygro* and *pFlag:PRMT6-puro*. Four triple-resistant clones—KEPconstitutive (KEPc)#37_KF, KEPc#39_KF, KEPc#42_KF, KEPc#44_KF—were isolated and subsequently transitioned to VALGÖX conditions, resulting in KEPc#37_VAL, KEPc#39_VAL, KEPc#42_VAL, and KEPc#44_VAL cells, respectively (**Fig. 3e**). Immunofluorescence analysis revealed membrane-bound expression of HA:ERAS and nuclear expression of KLF2:V5 and Flag:PRMT6 in both KEPc_KF and KEPc_VAL cells (**Figs. 3f, S3c**). Additionally, H3R2me3 mark levels were significantly increased, reflecting the activity of PRMT6's arginine methyltransferase protein. AKT phosphorylation also significantly increased, reflecting ERAS activity (**Fig. S3d**)⁵³, whereas expression of ESRRB, a target gene KLF2, was higher in KEPc cells than in control cells (**Fig. S3f**). Transitioning from KF to VAL substantially reduced the ratio of cells with nuclear foci observed after immunostaining for H3K27me3 and H2AK119Ub, indicating reactivation of the second X chromosome in the majority of KEPc_VAL cells (**Figs. 3f, 3g, S3c**). Overall, these findings demonstrate that the expression of KLF2:V5, HA:ERAS, and Flag:PRMT6, combined with the VALGÖX culture regimen, promotes epigenetic remodeling consistent with naïve-like pluripotency.

To further validate the transition from primed to naïve-like pluripotency states, we analyzed the transcriptomes of B19_KF, B19_VAL, KEPc_KF, and KEPc_VAL cell lines using RNA

sequencing. Principal component analysis (PCA) identified four distinct clusters among these PSC lines. The least significant difference was observed between B19_KF and B19_VAL, which exhibited 597 differentially-expressed genes (DEGs), while the most substantial difference was between B19_KF cells and KEFc_VAL cells, with 1,707 DEGs (**Figs. 3h, S3e**). In KEFc_VAL cells, there was an upregulation in the expression of naïve pluripotency genes such as *DPPA2*, *DPPA5*, *PRDM14*, *KHDC3L*, *FOLR1*, *ST6GAL1 (CD75)*, *TDRKH*, and *DNMT3B* compared to both B19_KF and B19_VAL. Conversely, the expression of primed pluripotency and gastrulation genes including *CER1*, *DKK1*, *TBXT*, and *EVX1* was reduced (**Figs. 3i, S3f**). Notably, genes like *DPPA5*, *PRDM14*, and *KHDC3L*, showed a pronounced increase in expression in KEFc_VAL cells compared to all other cell types, including KEFc_KF, underscoring the synergistic effect of KEP transgenes and the VALGöX culture regimen.

Furthermore, a heatmap of DEGs between B19_KF and KEFc_VAL was generated based on a list of 80 genes differentially expressed between various developmental stages of rabbit embryos—inner cell mass (E3.5), early epiblast (E4.0), mid-epiblast (E5.0), and late epiblast (E6.0 and E6.6) as identified in prior studies²⁸ (**Fig. 3j**). Fifty of these genes showed differential expression between B19_KF and KEFc_VAL cells. Notably, genes predominantly overexpressed in B19_KF cells aligned with stages E6.0 and E6.6, termed “primed” and “gastrulation,” while the majority of genes overexpressed in KEFc_VAL cells aligned with stages E3.5 and E4.0, termed “formative” and “naïve.” Overall, these results demonstrate that the expression of *KLF2:V5*, *HA:ERAS*, and *Flag:PRMT6* in rbiPSCs cultured in VALGöX effectively facilitates their conversion from primed to formative/naive-like pluripotency.

Enhanced colonization of rabbit embryos by iPSCs overexpressing KLF2, ERAS and PRMT6 in VALGöX culture condition

We next investigated the ability of KEFc cells to colonize rabbit embryos. KEFc#37_KF, KEFc#37_VAL, KEFc#44_KF, and KEFc#44_VAL cells were injected into early morula stage embryos at a ratio of eight cells per embryo. The injected embryos were then cultured for three days and developed into late blastocysts (3 days *in vitro*, DIV) (**Figs. 4a, S4**). In three independent experiments, 63% of the blastocysts displayed GFP⁺ cells following the injection of KEFc_VAL cells, compared to 23% for KEFc_KF cells and only 5% for parental iPS B19_KF cells (**Fig. 4b**). A significant difference was observed in the number of GFP⁺ cells among the three cell types. The majority of embryos injected with eight parental B19_KF or KEFc_KF cells contained fewer than five GFP⁺ cells after 3 DIV. Only three embryos (7%) injected with KEFc_KF cells had more than five (but fewer than ten) GFP⁺ cells. In stark contrast, embryos injected with eight KEFc_VAL cells demonstrated notably enhanced colonization. For KEFc#37_VAL, among GFP⁺ embryos, up to 66% of them contained over 10 GFP⁺ cells, and 50% had more than 20 GFP⁺ cells. The vast majority of the GFP⁺ cells expressed SOX2 (**Figs. 4a, S4**). Overall, these results indicate that the KEP transgenes, when combined with the VALGöX

culture regimen, significantly enhance both the growth and embryo colonization capabilities of rbiPSCs.

Design of a reversible KEP expression system for *in vivo* studies

We designed rbiPSCs to express *KLF2*, *ERAS* and *PRMT6* transgenes in an inducible manner. To achieve this, B19-GFP_KF cells were transfected with three plasmids encoding Shield1-activatable DD:KLF2:V5 (*pDD:KLF2:V5-neo*), DD:HA:ERAS (*pDD:HA:ERAS-hygro*), and DD:Flag:PRMT6 (*pDD:Flag:PRMT6-puro*). These vectors included a mutated FKBP12-derived destabilization domain (DD) fused to the coding sequence of KLF2:V5, HA:ERAS, and flag:PRMT6, enabling interaction and stabilization by Shield1⁵⁴. After transfection of B19_KF cells in the absence of Shield1, two triple-resistant cell lines, KEPI#13_KF and KEPI#18_KF, were established. These cell lines were then transferred to VALGÖX medium supplemented with Shield1 and cultured for three weeks, producing KEPI#13_VAL+S and KEPI#18_VAL+S (**Fig. 5a**). In a subsequent experiment, we transfected B19_KF cells with the same plasmids and immediately cultured them in VALGÖX medium with Shield1 for at least three weeks, resulting in KEPI#28_VAL+S and KEPI#36_VAL+S cells. We then cultured these cells in Shield1-free medium for seven days, resulting in KEPI#13_VAL+S-S, KEPI#18_VAL+S-S, KEPI#28_VAL+S-S, and KEPI#36_VAL+S-S, respectively. Following Shield1 withdrawal, there was almost complete silencing of ERAS and PRMT6 and partial silencing of KLF2 (**Figs. 5b, S5a**). The levels of H3R2me2/3 histone mark and phosphorylated AKT decreased (**Figs. S5a, S5c, S5d**). However, despite the withdrawal of Shield1, the number of cells with nuclei foci remained unchanged, suggesting that the XaXa status of KEPI cells was not altered (**Fig. S5b**). Transcriptome analysis of KEPI#_KF, KEPI#_VAL+S, and KEPI#_VAL+S-S cell lines was visualized using two-dimensional PCA (**Fig. 5c**). Activation of the transgenes in VALGÖX culture conditions caused significant transcriptome changes in the four analyzed clones. Changes induced by Shield1 withdrawal were minor in KEPI#13 cells, moderate in KEPI#18 cells, and substantial in KEPI#28 and KEPI#36 cells. Naïve pluripotency markers such as *DPPA2*, *DPPA5*, *KHDC3L*, *KLF4*, *PRDM14*, and *ZFP42* were downregulated, while primed pluripotency markers including *SALL1*, *CDH2*, *FGF5*, *PLAGL1*, and *DKK1* were upregulated in KEPI#_VAL+S-S cells compared to KEPI#_VAL+S (**Figs. 5d, S5e**). This indicates that transgene silencing shifted KEPI_VAL cells away from naïve-like pluripotency. Nevertheless, the Shield1-deprived cells continued to self-renew without any apparent differentiation.

To assess the embryonic colonization capacity of KEPI_VAL+S and KEPI_VAL+S-S cells, we injected eight cells from each cell line into rabbit morulae. A total of 35% of the blastocysts ($n = 350$) exhibited GFP⁺ cells following injection of KEPI_VAL+S cells, with specific rates of 25.8%, 26.3%, 42.6%, and 45.5% in clones #13, #18, #28, and #36, respectively. In comparison, 25% of blastocysts ($n = 201$) displayed GFP⁺ cells after injection of KEPI_VAL+S-S, with rates of 28.3%, 26.4%, 19.6%, and 28.2% in the same respective clones (**Figs. 5e, 5f**). The GFP⁺ cells were either organized in clusters or scattered throughout the embryo, including the

trophoblast. The average number of GFP⁺ cells per embryo was 6.5 (ranging from 1 to 27) following injection of KEPI_VAL+S cells (**Fig. 5g**). The vast majority of these GFP⁺ cells expressed SOX2, averaging 5.8 cells per embryo, with counts ranging from 1 to 27, and were predominantly localized in the epiblast (**Fig. 5h**). The average number of GFP⁺ and GFP⁺/SOX2⁺ cells slightly decreased in embryos injected with KEPI_VAL+S-S cells, showing 4.7 GFP⁺ cells per embryo (ranging from 1 to 10) (**Figs. 5g, 5h**). However, these counts remained substantially higher than those observed in embryos injected with parental B19_VAL cells, which averaged 1.25 GFP⁺ per embryo (ranging from 1 to 2) and one GFP⁺/SOX2⁺ cell per embryo (ranging from 0 to 2). In conclusion, we have developed a reversible KEP expression system that is instrumental in investigating the fate of KEP_VAL cell in chimeric embryos.

KEP_VAL cells with high CD75 expression exhibit significant colonization capacity

We previously observed that a sub-population of B19_VAL_KEP cells expressed high levels of CD75. Motivated by this observation, we investigated the presence and embryo colonization capabilities of a CD75^{high} cell sub-population within KEPI_VAL+S cells. CD75^{high} cells were FACS-sorted from both KEPI#13_VAL+S and KEPI#28_VAL+S cell populations and then cultured under two conditions: for 24 hours (Condition I) and for five days (Condition II) before injection into rabbit morulae (**Figs. 6a, 6b**). In condition I, 77% and 100% of embryos displayed GFP⁺ cells post-injection of KEPI#13_CD75^{high} and KEPI#28_CD75^{high} cells, respectively (**Figs. 6c, 6d**). Notably, 70% of embryos from KEPI#13 and all from KEPI#28 had incorporated more than 20 GFP⁺ cells (**Figs. 6e, S6a**). In Condition II, 51% and 100% of embryos showed GFP⁺ cells post-injection of KEPI#13_CD75^{high} and KEPI#28_CD75^{high} cells, respectively, with 32% and 63% of these embryos incorporating over 20 GFP⁺ cells. These results demonstrate that CD75^{high} cells in KEPI_VAL+S cell populations possess significantly enhanced capacities for epiblast and trophoblast colonization.

To explore the potential of CD75^{high} cells in contributing to the three germ layers and organogenesis, we injected 248 morulae with KEPI#28_CD75^{high} cells and cultured them for 24 hours. Subsequently, we transferred 224 of these to 14 surrogate female rabbits (**Table 1**). Out of 38 fetuses collected at E10, five exhibited extensive colonization by GFP⁺ cells (**Table 1, Figs. 6f, S6b, S6c**). Moreover, of the 18 fetuses analyzed by genomic PCR, 15 (83%) contained GFP DNA (**Table 1, Fig. S6d**). Notably, of the two placentas analyzed by genomic PCR, one contained GFP DNA. Phenotypic analysis of GFP⁺ cells in sections showed differentiation into various cell types, including SOX2⁺ neuronal progenitors, TUJ1⁺ neurons, SMA⁺ and DESMIN⁺ cardiac cells, PAX3⁺ somitic mesoderm, SOX17⁺ and CD31⁺ gut epithelium, and LAMININ⁺ surface ectoderm (**Figs. 6g, S6b, S6c**). These findings underscore the high efficiency of KEPI_CD75^{high} cells in contributing to tissue development of tissues from ectodermal, mesodermal, and endodermal origins in rabbit fetuses.

KEP_VAL_CD75^{high} cells produce viable chimeras.

To investigate the ability of CD75^{high} cells to contribute to development until term, 273 morulae were injected with KEPI#28_CD75^{high} cells, and 220 of these were subsequently transferred to 14 surrogate female rabbits. Of the 13 newborn rabbits obtained, two died shortly after birth due to developmental abnormalities in the heart and intestine. Five were abandoned by their mothers and had to be sacrificed—one on the first day (P1) and the others three days after birth (P5). The remaining six developed into viable young rabbits (**Table 1**). Both the two rabbits that died naturally and the five that were sacrificed were confirmed as chimeric by genomic PCR, performed on total DNA extracted from various organs including the brain, ears, lungs, heart, trachea, intestine, stomach, kidneys, spleen, liver, muscle, pancreas, testes/ovaries bladder, tongue, skull skin, tail, and eyes (**Figs. 7a, S7; Table S1**). Additionally, a variable proportion of GFP⁺ cells was observed in whole mounts (**Figs. 7b, 7c**) and in sections of the skin, heart, kidneys, brain, liver, and muscles, confirming the PCR data (**Figs. 7d**). The six viable rabbits were reared for four weeks before undergoing blood sampling and all were found to be chimeric (**Fig. 7e**). Chimerism was confirmed in five of the six young rabbits by buccal swab (**Fig. 7f**). In two of them (#1 and #2, respectively), fluorescence was readily detected in the nose, ear and tail (**Figs. 7g, S7b**). Overall, these findings demonstrate the high efficiency of KEPI_CD75^{high} cells in generating viable rabbit chimeras.

Transcriptomic signature of iPSCs associated with enhanced embryonic colonization

To identify potential determinants of enhanced embryonic colonization, we analyzed the transcriptome of B19_KF, B19_VAL, KEPc_KF, and KEPc_VAL cells. With KEPc_VAL cells showing a significantly higher colonization capacity compared to the other cell types, we focused on genes synergistically regulated by both KEP transgenes and VALGöX culture conditions. After removing DEGs associated solely with the 'VALGöX effect' (between B19_KF and B19_VAL) and the 'KEP effect' (between B19_KF and KEPc_KF) from the 1,707 DEGs identified between B19_KF and KEPc_VAL, we isolated 1,317 genes representing the 'KEP+VALGöX synergistic effect,' with 783 up-regulated and 534 down-regulated (**Figs. 8a, 8b**). KEGG pathway enrichment analysis of the upregulated genes highlighted significant involvement in amino acid metabolism pathways including glycine, serine, threonine, cysteine, methionine, and arginine (*e.g.*, *ACYP1*, *ALDH7A1*, *ALDH8A1*, *AMT*, *CKMT1B*, *CNDP1*, *CTH*, *GLDC*, *GNMT*, *GSS*, *PSAT1*, *PYCR2*, *SDS*, and *SMS*), and NF-κB signaling (*e.g.*, *BTK*, *EDARADD*, *ZAP70*, and *LTBR*) (**Figs. 8c, 8d, S8**). Conversely, downregulated genes were predominantly linked to the MAPK pathway (*e.g.*, *EGFR*, *PDGFRB*, *TGFBR2*, *ARAF*, *MAPKAPK2*, *DUSP2*, *MAP3K8*, and *ELK4*), both canonical and non-canonical WNT pathways (*e.g.*, *WNT5B*, *FZD3*, *FZD4*, *AXIN2*, *GPC4*, *DAAM1*, *PPP3CA*), the HIPPO pathway (*e.g.*, *LATS2*, *TAZ*, *KIBRA*, *TEAD1*, *TEAD4*, *PPP2R2B*), and axon guidance molecules (*e.g.*, *EFNB2*, *SEMA6D*, *NTN1*, *PLXNA2*, *EPHB1*, and *EPHA4*) (**Fig. 8d, S8**). This indicates a shift in KEPc_VAL

cells towards enhancing survival pathways while reducing pathways associated with differentiation and growth signaling.

We also analyzed B19_VAL and KEPI_VAL+S cells, identifying 339 up-regulated and 460 down-regulated DEGs. Pathway analysis showed these changes also emphasized altered amino acid metabolism and decreased signaling through MAPK, WNT, HIPPO, NETRIN, and EPHRIN pathways (**Figs. 8e, 8f**). Further, by comparing DEGs between KEPI_VAL+S and KEPI_VAL+S-S cells, we observed downregulation of genes involved in amino acid metabolism (e.g., *ALDH7A1*, *CTH*) upon transgene silencing and upregulation of genes in WNT, MAPK, and HIPPO pathways (e.g., *EGFR*, *PRICKLE2*, *LATS2*) (**Fig. S9a-c**). This transcriptomic reversal underscores the pivotal role of these pathways in maintaining the pluripotent state conducive to embryonic colonization. Interestingly, variability in the stability of these transcriptomic changes was observed among the KEPI_VAL cell lines: the average +S/+S-S fold-change calculated from the 42 DEGs varied significantly between cell lines, with the minimum variation in KEPI#13_VAL and KEPI#18_VAL and the maximum in KEPI#28_VAL and KEPI#36_VAL cells (**Fig. S9d**). These differences in stability correlated with their embryonic colonization efficiency, particularly noted in KEPI#28_VAL and KEPI#36_VAL compared to other lines.

In summary, our findings suggest that enhanced embryonic colonization capacity in KEPC_VAL and KEPI_VAL+S cells is linked to higher expression of genes involved in amino acid metabolism and NF- κ B signaling, alongside reduced activity in key developmental signaling pathways. This transcriptomic signature might be crucial for the heightened colonization abilities observed.

Discussion

In this study, we succeeded for the first time in producing viable chimeric rabbits using pluripotent stem cells. It is also the first time that viable chimeric animals have been produced in a non-rodent mammalian species. We have succeeded in this challenge by identifying a combination of three genes—*KLF2*, *PRMT6*, and *ERAS*—that enable rabbit iPSCs to acquire molecular and functional features of the naïve state including the capacity to efficiently colonize preimplantation embryos. *Klf2* encodes a transcription factor that participates in maintaining of the naïve state of pluripotency in mice^{35,42,55-59}. *KLF2* can also promote the conversion from a primed to a naïve state in human PSCs^{25,60}. *Prmt6* encodes an arginine methyltransferase that influences mESC self-renewal by controlling H3R2me levels. Specifically, knockdown of *Prmt6* leads to the downregulation of pluripotency genes and the induction of expression of differentiation markers⁴⁶. *Eras*, a member of the RAS family, is known to enhance the growth and tumorigenicity of mouse ESCs. However, expression of *Eras*

is not essential to mouse ESC pluripotency⁵³. In our study, we showed that overexpression of KLF2 was necessary and sufficient for iPSC self-renewal in VALGÖX, but iPSCs underwent a more comprehensive conversion when both PRMT6 and ERAS were included in the reprogramming cocktail. Specifically, overexpression of the three transgenes resulted in the expansion of a cell subpopulation expressing higher levels of the naïve marker CD75 and devoid of H3K27me3 foci, indicating exceptionally immature cells. These immature cells were not observed in KEP_KF cell populations and were barely detectable in KE_VAL, and KP_VAL cells. They emerged when KEP cells were derived in VALGÖX culture conditions. Similarly, the embryo colonization ability was virtually zero for parental iPSCs cultivated in KF, low for KEP_KF cells, moderate to high for KEP cells cultivated in VALGÖX, and very high for the CD75^{high} sub-population. Overall, these results indicate a synergy between the VALGÖX culture regimen and KEP transgenes that enables rabbit iPSCs to enter a functional naïve state, including an embryo colonization capability. Interestingly, a fraction of the chimeric embryos exhibited KEP-derived cells in both the epiblast and trophoblast, suggesting that some KEP cells have the characteristics of expanded pluripotency as defined in mice, pigs, and humans^{9,20,27}.

It remains unclear how PRMT6 and ERAS, working alongside KLF2, facilitate this conversion. Upregulation of PRMT6 has been linked to global DNA hypomethylation by impairing the chromatin binding of UHRF1, a co-factor of DNMT1, which results in passive DNA demethylation⁶¹. In various cancer cell lines, including those of breast, lung, colorectal, and cervical cancers, PRMT6 has been found to inhibit the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI) such as p21cip1/waf1, p27kip1, and p18ink4c, or to mitigate the association of p16ink4a with CDK4. This results in accelerated cell cycles and the inhibition of cellular senescence⁶²⁻⁶⁵. In breast and prostate cancer cell lines, PRMT6 has also been associated with reduced apoptosis and the regulation of motility and invasion^{66,67}. Indeed, the diverse roles of PRMT6 in cell cycle regulation, migration, and apoptosis appear to be integral to the primed-to-naïve state conversion and the embryo colonization capacity of KEP cells. These functions could potentially enhance the cells' fitness, improve their resistance to harsh environments, and boost their adaptability. The role of ERAS in enhancing the transition from a primed-to-naïve state and fostering subsequent chimeric competence is more elusive. Similar to PRMT6, ERAS is known to activate the AKT pathway and accelerate the mitotic cycle in mouse ESCs^{53,68}. We can speculate that its exogenous overexpression could have a substantial impact on the growth of rabbit iPSCs, which might explain why ERAS has consistently emerged in our screens. However, further investigation is necessary to confirm this hypothesis and fully understand the role of ERAS in the context of embryo colonization.

The cells KEPc and KEPi provide a unique opportunity to identify transcriptomic alterations and cellular functions that distinguish cells with high aptitude for embryonic colonization from those with little to no competence. Our findings reveal that chimeric competence is strongly associated with the transcriptional repression of genes involved in

MAPK, WNT, HIPPO, and EPH signaling pathways. These findings corroborate previous studies that emphasized the role of inhibiting the MAPK, WNT, HIPPO pathway in capturing and preserving naïve pluripotency^{23,69-71}. The down-regulation of EPH receptors and ephrin ligands is a novel finding, aligning with the overarching role of EPH-ephrin signaling in counteracting self-renewal in progenitor cells of the nervous system, skin, and intestinal stem cells, as well as in cancer stem cells^{72,73}. Further investigation is necessary to clarify the role of EPH-ephrin signaling in naïve pluripotency and embryo colonization capability. Furthermore, the chimeric competence of KEPC and KEPi cells is associated with the transcriptional activation of genes involved in threonine, methionine, glycine and serine metabolism. These findings are consistent with results in mice and humans demonstrating the dependence of ESCs on threonine and methionine metabolism for self-renewal and pluripotency maintenance⁷⁴⁻⁷⁶. In mESCs, threonine metabolism supplies methyl groups for maintaining a high ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine to promote H3K4me3, which is critical to the maintenance of naïve pluripotency^{75,77,78}. In human ESCs/iPSCs, methionine metabolism replaces threonine metabolism in this function⁷⁶. Which of these two pathways prevails in rabbits iPSCs is unknown.

KEPi cell populations include a subset that expresses the naïve marker CD75 at significantly higher levels than average. These CD75-high cells have reactivated the second X chromosome. They demonstrate a remarkable capacity for colonization of both the epiblast and trophoblast, characteristic of EPSCs⁹, resulting in chimeric fetuses and newborns with substantial contributions from iPSCs in every organ analyzed. By compiling results from analyses conducted on 10-day-old fetuses, newborns, and young rabbits, we determined a chimeric animal rate of 90%. The rate of chimerism is highly variable from one organ to another, up to 50%. Specifically, the rate of chimeric animals and chimerism are comparable to those observed in mice following ESC injection. This provides a powerful tool for gene invalidation and developmental studies in rabbits.

Experimental procedures

Plasmid constructs

Lentiviral vectors: the simian immunodeficiency virus (SIV)-based vector *pW10-eGFP*⁷⁹ was utilized as a backbone vector for generating the cDNA library. All cDNAs (PCR products) were amplified either from plasmids or from reverse transcribed human PSC RNAs. The origin of cDNAs and the primers for PCR amplification are given in **Table S2**. eGFP was replaced by the cDNAs by subcloning into the *XhoI* restriction site or between the *AfeI* and *XhoI* restriction sites of *pW10-eGFP*.

DPPA2^{mKO2}: two 23 base-pair (bp) guide RNA sequences (5'-CGGCCAGGAGAATGTAAAGA TGG-3' and 5-ACATTATAGCAGCAGCGAGATTGG-3') were synthesized (Eurofin). The DNA template for homology-directed repair was constructed in four successive steps. First, a 826 bp fragment encompassing the 5' region of *DPPA2* was amplified from rabbit genomic DNA using primers 5'-AGGCCACGTGTCTTGTCCAGAGCTCTCATCTGCTGTATCTGCC-3' and 5'-CA TTTTCAGATCGGCCAGGAGAATGTAAAGATGTCAATG-3'. Second, a 1205 bp fragment containing the coding sequence of the mKO2 fluorescent protein was amplified from pFucciG₁ Orange (MBL Life Science, AM-V9003M) using primers 5'-ACATTCTCTGGCCGATC3' and 5'-TTAAGGGTTATTGAATATGATCGC-3'. Third, nested PCR was performed on the 826 bp and 1205 bp fragments using primers 5'-GTCTTGCCAGAGCTCTC-3' and 5'-TTAAGGGTTATTGAATATGATCGC-3'. The resulting 1953 bp fragment was subcloned between the *SacI* and *AvrII* sites of plasmid *pMA-PGK-neo* (GeneArt LifeTechnologies) to generate *pMA-5'DPPA2-mKO2-PGK-neo-pA*. Finally, the 3' region of *DPPA2* was amplified from rabbit genomic DNA using primers 5'-CTTACAGGCGCGCCGAGATGGTAAGTTTTGT TCTAC-3' and 5'-ATCATTGGTACCA GCCTAGGTTAACACTTCC-3'. The resulting 819 bp fragment was subcloned between *Ascl* and *KpnI* sites in *pMA-5'DPPA2-mKO2-PGK-neo-pA* to generate *pMA-5'DPPA2-mKO2-PGK-neo-pA-3'DPPA2*.

EOS^{tagBFP}: The double insulator *5'HS4* was amplified from the *pHSC1-HS4* plasmid⁸⁰ using primers 5'-GAATCTGCGCCTAGAAAGCTTTTTCCCGTATC-3' and 5'-TAACAGGCCTTA AGCGCTAGCATTGAGCT-3' and subcloned into the *NheI* site of *PB-loxP-loxP-PGK-Hygro*⁸¹. Then, a 1593 bp fragment containing the PGK promoter, *neo* gene, and polyadenylation signal of the *PGK* gene, was amplified with primers 5'-ATATATTTTCTTGTTATAGATATCTAT CCAACTATGAAACATTATCATAAG-3' and 5'-CATTATACGAAGTTATGATATCTAATTCTA CCGGGTAGGG-3' and inserted into the *EcoRV* site of *PB-loxP-loxP-PGK-Hygro* to generate *PB-loxP-loxP-PGK-neo'*. *TagBFP* was amplified as a 757 bp fragment with primers 5'GCGCTTAAGGCCTGTTAACGAATTAGCCATGAGCGAGCTGATTAAG-3' and 5'-GAGGGA GAGGGGCGGAATTCATTACGCCTTAATTAAGCTTG-3' and subcloned between the *HpaI* and *EcoRI* sites. Finally, the *EOS* promoter was amplified with primers 5'- GCGCTTAAGGCC TGTTAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGC-3' and 5'- CTCATGGCTAATTCGTTTGTGCG CCGCCAGCAG-3' from plasmid *pL-SIN-EOS-C(3+)-EiP*³⁰ and inserted into the *HpaI* site. All construction steps were carried out using the Gibson assembly mix (NEB) and validated by sequencing.

Tagged cDNAs:

- *HA:ERAS* was amplified from *pW10-ERAS* using primers 5'-CGTGGAGGAGAACCCC GGCCCATGACCGAGTACAAGCCCACG-3' and 5'-GATCTAGCTAGCGCCACCA TGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGGAGCTGCCAACAAGCC-3'. The resulting 746 bp fragment was sub-cloned between *NheI* and *HpaI* in *PB-CAG/hygro* to generate *PB-CAG-HA:ERAS-bGHpA-PGKpA-hygro-PGK* (designated as *pCAGHA:ERAS-hygro*).

- *HA:ERAS:DD* was amplified from the *pEX-A128-space-NheI-DD* plasmid (Eurofin) using primers 5'-TTCAATGCTAGCGCCACC-3' and 5'-CCAGGCCAGGTCTGAAGG TGCCAGGCTTTGTTGGCAGCTCCATAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATT CCGGTTTTAGAAGCTCCAC-3'. The resulting 405 bp fragment was sub-cloned between *NheI* and *MscI* in *PB-CAG-HA:ERAS-bGHpA-PGKpA-hygro-PGK* to generate *PB-CAG-HA:ERAS:DD-bGHpA-PGKpA-hygro-PGK* (designated as *pCAGHA:ERAS:DD-hygro*).
- *KLF2:V5* was amplified from plasmid *pW10-KLF2* using the primers 5'-TTCAATGCTAGCGCCACC-3' and 5'-AGCGCTCCTGCAGGCCGCGCTCGCGGCA CGGGCTGGCGAAAGTGGAGAAGGACGGCAGGATGGGTTCACTCAGCGCCATT TCCGGTTTTAGAAGCTCCAC-3'. The resulting 1133 bp fragment was sub-cloned between *NheI* and *HpaI* in *PB-CAG/neo* to generate *PB-CAG-KLF2:V5-bGHpAPGKpA-neo-PGK* (designated as *pCAG-KLF2:V5-neo*).
- *KLF2:V5:DD* was amplified from *pEX-A128-space-NheI-DD* using primers 5'-TTCAATGCTAGCGCCACC-3' and 5'-AGCGCTCCTGCAGGCCGCGCTCGCGGCA CGGGCTGGCGAAAGTGGAGAAGGACGGCAGGATGGGTTCACTCAGCGCCATT TCCGGTTTTAGAAGCTCCAC-3'. The resulting 406 bp fragment was sub-cloned between *NheI* and *SbfI* in *PB-CAG-KLF2:V5-bGHpA-PGKpA-neo-PGK* to generate *PB-CAG-KLF2:V5:DD-bGHpA-PGKpA-neo-PGK* (designated as *pCAG-KLF2:V5:DD-neo*).
- *Flag:PRMT6* was amplified from plasmid *pW10-PRMT6* using primers 5'-GATCTAGCTAGCGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGAGCCCAAT GTCGCAGCCCAAGAAAAG-3' and 5'-AACTCAGTCCTCCATGGCAAAG-3'. The resulting 1175 bp fragment was sub-cloned between *NheI* and *HpaI* in *PB-CAG/puro* to generate *PB-CAG-Flag:PRMT6-bGHpA-PGKpA-puro-PGK* (designated as *pCAGFlag:PRMT6-puro*).
- *Flag:PRMT6:DD* was amplified by nested-PCR from *pEX-A128-space-NheI-DD* and *pW10-PRMT6* using primers 5'-TTCAATGCTAGCGCCACC-3', 5'-CTTATCGTCGTC ATCCTTGTAATCCATTTCCGGTTTTAGAAGCTCCAC-3', 5'-ATGGATTACAAGGAT GACGACG-3' and 5'-TAGTGCTGCTTACCTGG-3'. The resulting 1012 bp fragment was sub-cloned between *NheI* and *OliI* in *PB-CAG-Flag:PRMT6-bGHpA-PGKpApuro-PGK* to generate *PB-CAG-Flag:PRMT6:DD-bGHpA-PGKpA-puro-PGK* (designated as *pCAG-DD:Flag:PRMT6-puro*).

Media composition, culture, and electroporation

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were prepared from 12.5-day-old embryos of OF1 or DR4 mice (Charles River). Conventional rabbit iPSCs B19_GFP^{21,22}, NaiveRep_KF, and KEP_KF cell lines were routinely cultured on mitomycin C-treated MEFs (1.6×10^4 MEFs/cm²) in medium designated as KF comprising Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12

supplemented with 1% non-essential amino acids, 1% solution of 10,000 U/mL penicillin, 10,000 U/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 μ M 2-mercaptoethanol, 20% knockout serum replacement (KOSR), and 10 ng/mL FGF2. The culture medium was replaced every day, and cells were routinely dissociated every 2 or 3 days into single cells by treatment with 0.05% trypsin–EDTA. In NaiveRep_KSR/LIF cells, FGF2 was replaced by LIF (medium designated as KSR/LIF). In NaiveRep_FCS/LIF cells, KSR and FGF2 were replaced by FCS and LIF (medium designated as FCS/LIF). NaiveRep_VAL and KEP_VAL cells were cultured on Matrigel in a medium designated as VALGöX, comprising MEF-conditioned N2B27 basal media supplemented with 1% non-essential amino acids, 1% solution of 10,000 U/mL penicillin, 10,000 U/mL streptomycin, 29.2 mg/mL L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 μ M 2-b-mercaptoethanol, 50 μ g/mL activin A, 10,000 U/mL leukemia inhibitory factor (LIF), 250 μ M Vitamin C, 2.5 μ M Gö6983, and 2.5 μ M XAV939. The culture medium was replaced every day, and cells were routinely dissociated every 2 or 3 days into single cells by treatment with 0.05% trypsin–EDTA. Shield1 (10 to 1000 nM) was added as indicated.

To establish the NaiveRep cell line, 10^6 B19_GFP cells were co-transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 1 μ g of *pCAG-Cas9D10A-sgDPPA2(x2)* plasmid and 1 μ g of *pMA-5'DPPA2-mKO2-PGK-neo-pA-3'DPPA2* template. G418 (250 μ g/mL) was applied for 7 days prior to colony picking and DNA analysis. “On target” integration of the DNA template was verified by PCR using the following primer pair: 5'GCAGAGTAAGCCCACTCCAG-3' and 5'-GACCATCGGCAGGAAAGTTA-3'. Heterozygote integrations were distinguished from homozygotes integrations using the following primer pairs: 5'-GCAGAGTAAGCCCACTCCAG-3' and 5'-ACGAGAAAAGCAA GCAGGTC-3'. In a second step, 10^6 B19_GFP_DPPA2^{mKO2} cells were co-transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 1 μ g of *pEOS^{tagBFP}* plasmid plus 2 μ g of the PBase-expressing vector *pCAGPBase*⁸². Puromycin (1 μ g/mL) was applied for 7 days to select stable transfectants.

To establish PiggyBac (PB) transgenic lines, 10^6 cells were co-transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 1 μ g of PB plasmid plus 2 μ g of the PBase-expressing vector *pCAGPBase*⁸². Stable transfectants were selected in G418 (250 μ g/mL), hygromycin (200 μ g/mL), or puromycin (1 μ g/mL) for 7 days.

Virus production, infection of rabbit iPSCs, and cDNA library screening

2×10^6 293FT cells (ATCC, ref CRL-3467) were transfected with a DNA mixture containing 4,2 μ g of the *pMD2G* plasmid encoding the vesicular stomatitis virus glycoprotein envelope (Addgene, ref #12259), 10 μ g of *psPAX2* plasmid encoding the gag, pol, tat, and rev proteins (Addgene, ref #12260), and 12 μ g of the *pW10* plasmid carrying the lentiviral genome⁷⁹ using the calcium phosphate precipitation technique. The following day, cells were incubated with 5 mL of fresh DMEM and further cultured for 24 h. The supernatant was then collected, filtered (0.8 μ m), cleared by centrifugation (3000 rpm, 5 min, 4°C), and concentrated by ultracentrifugation on 20% sucrose (140,000 g, 2 h, 4°C).

Prior to infection, 2.4×10^5 NaiveRep_KF were dissociated with Trypsin-EDTA, and cells were transferred to fresh medium containing viruses at MOI's of 10 to 50, in the presence of 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene. Cells were incubated in suspension for 5 h at 37°C before being replated on fresh feeder cells in KF, FCS/LIF, or KSR/LIF culture media, or on Matrigel-coated dishes in VALGöX medium, at a density of 100 cells/cm². Colonies showing mKO2 and/or tagBFP fluorescence were picked after 7 to 10 days and expanded.

Genomic PCR amplification of proviral DNAs

Proviral DNAs were identified by PCR on genomic DNA, either using the Quick-Load Taq2X Master Mix enzyme (NEB, M0271S), or with the Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerase (NEB, M0493S) and the addition of GC enhancer to aid in the amplification of GC-rich segments. The primer sequences are given in **Table S3**.

Cell microinjection, embryo culture and transfer to surrogate rabbits

All procedures in rabbits were approved by the French ethics committee CELYNE (approval number APAFIS#6438 and APAFIS#39573). Rabbit embryos were produced by ovarian stimulation. Sexually mature New Zealand white rabbits (Hycole, Marcoing, France) were injected with follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone, followed by artificial insemination or breeding with color male, as previously described⁸³. Eight-cell stage embryos (E1.5) were flushed from explanted oviducts 36–40 h after insemination and cultured in a 1:1:1 mixture of RPMI 1640 medium, DMEM, and Ham's F10 (RDH medium; Thermo Fisher Scientific) at 38°C in 5% CO₂ until cell microinjection. Eight cells were microinjected inside early morula (E2.8) stage rabbit embryos. The embryos were further cultured for 24h in a 1:1 mixture of cell culture medium and RDH (with or without Shield1). Embryos were then either further cultured in RDH medium (with or without Shield1) after removal of the mucus coat with pronase, or transferred into surrogate mothers. On the day of transfer, eight embryos were transferred to each oviduct of the recipient by laparoscopy⁸⁴. Seven days after transfer, post-implantation embryos (E10.5) were recovered by dissection of the explanted uterine horns.

Immunofluorescence analysis of cells and embryos.

Epifluorescent and phase contrast imaging of live cells and chimeric embryos, following injection with GFP⁺ cells (at the blastocyst stage, 3DIV, or at E10.5 upon collection), was conducted using a conventional fluorescence microscope (TiS; Nikon). This microscope is equipped with DAPI (Ex 377/50, Em 447/60), mKO2 (Ex 546/10, Em 585/40) and GFP (Ex 472/30, Em 520/35) filters. The images were analyzed using NIS-Elements imaging software.

For immunofluorescence analysis, cells and preimplantation embryos were fixed in 4% PFA for 20 min at room temperature. After three washes in phosphate-buffered saline (PBS), they were permeabilized in PBS-0.5% TritonX100 for 30 min and blocked in 2% BSA for 1 h at room temperature. For 5-methylcytosine immunolabeling, cells were permeabilized in PBS-0.5% Triton for 15 min, washed in PBS for 20 min, then incubated in 2M HCl for 30 min prior blocking as above. In all cases, cells and embryos were subsequently incubated with primary antibodies diluted in blocking solution overnight at 4°C. Primary antibodies include: anti-SOX2 (Bio-Techne, ref AF2018, dilution 1:100), anti-GFP (Invitrogen, ref A10262, dilution 1:200), anti-OCT4 (StemAB, ref 09-0023, dilution 1:200), anti-DPPA5 (R&D systems, ref AF3125, dilution 1:100), anti-OOEP (Abcam ref 185478, dilution 1:100), anti-ubiquityl-Histone H2A Lys119 (Cell Signaling, ref #8240, dilution 1 :300), anti-Tri-methyl Histone H3 Lys27 (Cell Signaling, ref #9733, dilution 1:400), anti-Tri-methyl Histone H3 Lys4 (Cell Signaling, ref #9751, dilution 1:400), anti-Histone H3 (acetyl K14) (Abcam, ref ab52946, dilution 1:400), anti-Histone H3 tri methyl K9 (Abcam, ref ab8898, dilution 1:400), anti-Histone H3 (asymmetric di methyl R2) (Abcam, ref ab175007, dilution 1:400), anti-5-methylcytosine (EMD Millipore, ref MABE146, dilution 1:400), and anti-CD75 (Abcam, ref ab 77676, dilution 1:1000). After two washes (2 x 15 min) in PBS, they were incubated in secondary antibodies diluted in blocking solution at a dilution of 1:400 for 1 h at room temperature. Primary antibodies (diluted 1:500 for all of them) include: donkey anti-goat (Alexa Fluor 555) (Invitrogen ref A21432), donkey anti-chicken (Alexa Fluor 488) (Jackson ImmunoResearch, ref 703-545-155), donkey anti-mouse (Alexa Fluor 647, Invitrogen, ref A21448), donkey antirabbit (Alexa Fluor 555, Invitrogen, ref A31572) and donkey anti-rabbit (Alexa Fluor 647; Invitrogen, ref A31573). Finally, they were transferred through several washes of PBS before staining DNA with DAPI (0.5µg/mL) for 10 min at room temperature. Cells and embryos were analyzed by confocal imaging (DM 6000 CS SP5; Leica). Z-stacks were acquired with a frame size of 1024 x 1024, a pixel depth of 8 bits, and a z-distance of 1µm between optical sections for cells and 5µm for embryos. Acquisitions were performed using an oil immersion objective (40x/1.25 0.75, PL APO HCX; Leica) for cells and a water immersion objective (25x/1.25 0.75, PL APO HCX; Leica) for embryos.

Post-implantation embryos (E10.5) were fixed in 2% paraformaldehyde (PFA) prior to inclusion in OCT and cryo-sectioned. Newborns were dissected and organs were fixed in 2% PFA, embedded in OCT and cryo-sectioned. Transversal sections, 20 µm thick, were prepared and mounted on Superfrost Plus glass slides (Thermo Scientific) before being stored at -20°C. For immunostaining, cryosections were air-dried for 30 min and rehydrated in phosphatebuffered saline (PBS) for 30 min. The slides were then rinsed three times in 0.5% TritonX100 in PBS and blocked in PBS supplemented with 2% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in 2% BSA. These included: anti-SOX2 (Bio-Techne, ref AF2018, 1:100), anti-GFP (Invitrogen, ref A10262, dilution 1:200), anti-TUJ1 (Sigma, ref T8660, 1:10000), anti-smooth muscle actin (SMA; Millipore, ref CBL171, 1:500), anti-LAMININ (Sigma, ref I9393, 1:100), anti-PAX3 (DSMB, ref

3929, 1:500), anti-CD31/PECAM-1 (Bio-technie, ref AF806, 1:100), anti-DESMIN (Abcam, ab32362, 1:200), and anti-SOX17 (Bio-Techne, ref AF1924, 1:25). After two washes in PBS, relevant secondary antibodies were incubated in 2% BSA for 1 h at room temperature, at 1:400 dilutions for all: Alexa Fluor 488 goat anti-chicken (Abcam, ab63507), Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen, ref A21448), Alexa Fluor 647 donkey anti-goat IgG (Invitrogen, A21447), and Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen, ref A31573).

Nuclear staining was performed using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 0.5µg/mL in PBS) for 10 min at room temperature. Mounting was done in Vectashield with DAPI (Vectorlabs, H-1200-10). Confocal examination of the fluorescent labeling was conducted on a LEICA DM 6000 CS SP5 equipped with an Argon laser (488 nm), a HeNe laser (633 nm), and a diode at 405 nm. Acquisitions were made using oil immersion objectives (x20 and x40) with the LAS AF software (Leica). Z-stacks were acquired with a frame size of 2048 x 2048 and a z-distance of 1 µm between optical sections.

Genomic PCR amplification of *GFP* in E10.5 embryos, blood samples, and buccal swabs

Blood samples were collected from ear vessels using heparin vacutainers. Oral cavity specimens were collected by rolling a sterile flocced swab in the mouth. Swabs were immediately immersed in PBS. DNA from blood samples and oral cavity specimens were extracted using QIAamp DNA mini kit (Qiagen). Briefly, 200 µL blood or cell suspension from oral swab were lysed in 200 µL of AL buffer supplemented with Proteinase K at 56°C for 10 min followed by addition of 200 µL of absolute ethanol. Lysates were loaded onto a QIAamp Mini Spin column and centrifugated at 8000 rpm for 1 min. After two washes with AW1 and AW2 buffer, 50 µL AE buffer was added and incubated for 5 min. DNA were collected by centrifugation at 8000rpm. For 1 min. DNA concentrations were measured by Nanodrop 2000. For *GFP* detection, PCR reactions are performed using the Q5® Hot Start High-Fidelity DNA

Polymerase kit and GFP primers (Forward primer: 5'-GGCACAAGCTGGAGTACAAC-3', Reverse primer: 5'-GTGGCGGATCTTGAAGTTCAC-3'). Briefly, in a 25 µL reaction, 500 µg of DNA sample with an adjusted volume of water is added to the master mix composed of 5µL 5x Q5 Reaction buffer, 0.5µL 10mM dNTPs, 1.25 µL 10µM forward primer, 1.25 µL 10µM reverse primer and 0.25µL Q5 Hot Start High-Fidelity polymerase. Thermocycling conditions are 98°C for 30s, 30 cycles of 98°C - 10s, 62°C - 30s, 72°C - 30s; 72°C - 2 min; 4°C - hold. The electrophoresis is performed on SYBR safe-stained 3% agarose gel at 140 Volts for 45 minutes.

Flow cytometry analysis and sorting

Cells were dissociated to single cell suspension with 0.1% trypsin, and incubated in 10% fetal bovine serum for 15 min at room temperature for epitope blocking. Cells were subsequently incubated with CD75 primary antibody (Abcam, ref ab77676; dilution 1:1000) for 30 min at room temperature, followed by goat anti-mouse IgG secondary antibody coupled to Alexa

Fluor™ Plus 647 (Invitrogen, ref A32728; dilution 1:200) for 30 min. After several washes in PBS, cells were analyzed using LSRFortessa™ X-20 Cell Analyzer (Beckton Dickinson), and the data were analyzed using FlowJo software. The CD75^{high} sub-population was sorted using FACS Aria™ III Sorter (Beckton Dickinson).

Western Blotting

Cells were lysed in cold RIPA lysis buffer (0.5% NP-40, 1% Triton-X, 10% glycerol, 20 mM Hepes pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 0.1% DTT, and protease inhibitors (Roche, ref #05 892 970 001) for 4 h at 4°C. Lysates were cleared by centrifugation for 15 min and stored at -80°C. Protein concentrations were measured using Bradford assay. For SDS-PAGE electrophoresis, 30µg of total proteins were loaded onto each well of Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels (10%, Biorad, ref # 4568031), and migrated for 45 min at 120 Volts. Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad, ref # 1610374) were used as protein ladder. After electroporation, proteins were transferred onto membranes using Trans-Blot® Turbo™ RTA Midi 0.2 µm Nitrocellulose Transfer Kit (Biorad, ref #1704271). The membranes were subsequently blocked in TBST solution (200 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 0.1% Tween20, 5% milk) for 1 h at RT, prior to incubation with primary antibodies diluted in TBST at 4°C for 12 hours. Primary antibodies include: anti-V5 Tag (Invitrogen, ref R96025, 1:500), anti-HA (Sigma-Aldrich, ref H6908, 1:500), anti-Akt (pan) (Cell Signaling, ref #4691, 1:1000), anti-Phospho-Akt (Ser473) (Cell Signaling, ref #4060, 1:1000), and anti-beta-actin (Sigma-Aldrich, ref A3854, 1:10000). Membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch anti-mouse ref 211-032-171 and anti-goat ref 115-035-146, dilution 1:5000) for 1 h at RT. After serial washing in TBST, HRP activity was revealed using Clarity™ Western ECL substrate (Biorad, ref #170-5060) and ChemiDoc™ MP imaging system (Biorad).

RNA extraction and RNA sequencing

Total RNA was isolated using trizol/chloroform protocol followed by RNeasy mini kit (Qiagen ref #74106) with a DNase I (Qiagen, ref #79254) treatment. Three nanograms of total RNA were used for amplification using the SMART-Seq V4 Ultra Low Input RNA kit (Clontech) according to the manufacturer's recommendations (10 PCR cycles were performed). cDNA quality was assessed on an Agilent Bioanalyzer 2100, using an Agilent High Sensitivity DNA Kit. Libraries were prepared from 0.15 ng cDNA using the Nextera XT Illumina library preparation kit. Libraries were pooled in equimolar proportions and sequenced (Paired-end 50– 34 bp) on an Illumina NextSeq500 instrument, using a NextSeq 500 High Output 75 cycles kit. Demultiplexing was performed using bcl2fastq2 (version 2.18.12) and adapters were trimmed with Cutadapt (version 1.15 and 3.2) so that only reads longer than 10 bp were kept. Number of reads ranged from 10 to 200 million post adapter trimming. Reads were mapped to the rabbit genome (*OryCun2_ensembl92*) using tophat2. 49.8 to 58.4% (depending on samples) of the pair fragments could be uniquely mapped to gene reference.

Image analysis

Fluorescent profiles measurement were generated using Fiji⁸⁵, and 3D reconstructions were performed using Imaris Viewer. Quantitative image analysis was conducted using Fiji. Briefly, after z-projection of the stack (sum slices function), nuclei were first segmented using an automatically set threshold and watershed separation. Signals to be quantified were then segmented with the masks defined by the nuclei. For segmenting the spot corresponding to the X-chromosome, the size and the circularity of the objects to be detected within each nucleus were determined with the control group. The same parameters were then used on the other groups to determine how many spots could be detected per cell. For all detected objects, the area and mean intensity were calculated and exported for statistical analysis in Microsoft Excel file format.

Bioinformatics Analysis

Each sample was analyzed in three biological replicates produced at least one week apart. For bulk RNA-seq, count tables were generated using FeatureCounts (version 1.5.0-p2). All analyses were executed using R software (version 4.1.2). Data normalization, gene expression levels, and PCA were performed using the DESeq2 R package (version 1.34.0)⁸⁶. Mean expression levels and standard deviations were calculated using the R base package (version 4.1.2) for each sample. After log₂ transformation, normalized counts were used to produce heatmaps with the pheatmap R package (version 1.9.12). DESeq2 computed log₂ transformed Fold Change (FC) and p-values for each feature. Differentially expressed genes (DEGs) were determined by Over-Representation Analysis (ORA) using DESeq2 results and the following thresholds: $FC > 2 \cup FC < (-2)$, p-value < 0.01 or < 0.05 as indicated. Venn diagrams were produced using the VennDiagram package (version 1.7.3) and volcano plots were designed using the ggplot2 package (version 3.4.1). Finally, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway enrichment analysis was performed using the EnrichR⁸⁷ web tool and the human KEGG pathways database (release 2021). Gene expression analysis at the single-cell level in rabbit embryos was carried out using data from Bouchereau et al., 2022 (GSE180048). The dataset was processed using the Seurat R package (version 4.3.0). Bulk RNA-seq data from rabbit embryos were retrieved from Bouchereau et al., 2022²⁸ (PRJNA743177) and were analyzed using the DESeq2 R package.

Quantification and statistical analysis

The Mann-Whitney U test, suitable for non-normal distribution was conducted using the R base package (version 4.1.2) to compare medians between samples. A difference was considered significant if the p-value associated with the difference between medians was less than 0.05. For immunofluorescence analysis, either conventional T-test or Welch's unequal variances ttest was employed. The SuperPlotsOfData tool⁸⁸ was utilized to account for all measurements and biological replicates in these comparisons.

Data and code availability

RNA-seq data have been deposited at GEO (GSE250288).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE250288>

Original western blot images have been deposited at Mendeley:

<https://data.mendeley.com/preview/fr4j7thttr?a=eb7adef1-6551-48ba-99b5-fda7d1f7e1a2>.

Confocal microscopy data reported in this paper will be shared by the lead contact upon request.

Acknowledgements

We are grateful to Guillaume Marcy for his invaluable help with the bioinformatic analysis, and Doroth e Pattie for her help with the histological analysis. This work has benefited from the facilities and expertise of the high throughput sequencing core facility of I2BC (Yan Jaszczyszyn, Magali Perrois, Centre de Recherche de Gif, <http://www.i2bc.paris-saclay.fr/>), the cytometry core facility of CRCL (Priscillia Battiston-Montagne, Thibault Andrieux, Centre de Recherche en Canc erologie de Lyon, <https://www.crcl.fr/en/platforms/flow-cytometry-corefacility/>), and the staff members of the animal facility of SBRI (Stem cell and Brain Research Institute, <https://sbri.fr/>). This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (contracts ANR-18-CE13-023, ORYCTOCELL; ANR-21-CE20-0018-01, CHROMNESS), the Fondation pour la Recherche M dicale (DEQ20170336757 to P.S.), the Infrastructures Nationales en Biologie et Sant e (ANR-11-INBS-0009, INGESTEM; CRB-Anim, ANR-11INBS-0003), the IHU-B CESAME (ANR-10-IBHU-003), the LabExs (ANR-10-LABX-73, REVIVE; ANR-10-LABX-0061, DEVweCAN; ANR-11-LABX-0042, CORTEX), and the University of Lyon within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007).

Author contributions

Investigation: F.P., H-T.P., Y.P., N.D., F.W., A.M., S.R-G., E.DSF, M.R., M.A., N.B.

Formal analysis: Y.P., L.J., V.D.

Writing original draft, Funding acquisition: P.S., NB

Conceptualization, Supervision, Validation, Visualization, Project administration, Manuscript review and editing: P.S., M.A., N.B.

Resources: S. R-G., T.J., B.P.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

Materials and Correspondence

Material and correspondence should be addressed to
Nathalie Beaujean: nathalie.beaujean@inserm.fr

References

- 1 Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H. & Robertson, E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**, 255-256, doi:10.1038/309255a0 (1984).
- 2 Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-319 (2007).
- 3 Nichols, J. & Smith, A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* **4**, 487-492, doi:10.1016/j.stem.2009.05.015 (2009).
- 4 Brons, I. G. *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**, 191-195 (2007).
- 5 Tesar, P. J. *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196-199 (2007).
- 6 Ohtsuka, S., Nishikawa-Torikai, S. & Niwa, H. E-cadherin promotes incorporation of mouse epiblast stem cells into normal development. *PLoS ONE* **7**, e45220, doi:10.1371/journal.pone.0045220 (2012).
- 7 Masaki, H. *et al.* Inhibition of Apoptosis Overcomes Stage-Related Compatibility Barriers to Chimera Formation in Mouse Embryos. *Cell Stem Cell* **19**, 587-592, doi:10.1016/j.stem.2016.10.013 (2016).
- 8 Macfarlan, T. S. *et al.* Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* **487**, 57-63, doi:10.1038/nature11244 (2012).
- 9 Yang, J. *et al.* Establishment of mouse expanded potential stem cells. *Nature* **550**, 393397, doi:10.1038/nature24052 (2017).
- 10 Yang, M. *et al.* Chemical-induced chromatin remodeling reprograms mouse ESCs to totipotent-like stem cells. *Cell Stem Cell*, doi:10.1016/j.stem.2022.01.010 (2022).
- 11 Shen, H. *et al.* Mouse totipotent stem cells captured and maintained through spliceosomal repression. *Cell*, doi:10.1016/j.cell.2021.04.020 (2021).
- 12 Hu, Y. *et al.* Induction of mouse totipotent stem cells by a defined chemical cocktail. *Nature*, doi:10.1038/s41586-022-04967-9 (2022).
- 13 Madeja, Z. E., Pawlak, P. & Piliszek, A. Beyond the mouse: non-rodent animal models for study of early mammalian development and biomedical research. *Int J Dev Biol* **63**, 187-201, doi:10.1387/ijdb.180414ap (2019).

- 14 Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A. & Duranthon, V. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* **144**, 1-10, doi:10.1530/REP-12-0091 (2012).
- 15 Tanihara, F., Hirata, M. & Otoi, T. Current status of the application of gene editing in pigs. *The Journal of reproduction and development* **67**, 177-187, doi:10.1262/jrd.2021025 (2021).
- 16 Maynard, L. H., Humbert, O., Peterson, C. W. & Kiem, H. P. Genome editing in large animal models. *Mol Ther* **29**, 3140-3152, doi:10.1016/j.ymthe.2021.09.026 (2021).
- 17 Pan, M. T., Zhang, H., Li, X. J. & Guo, X. Y. Genetically modified non-human primate models for research on neurodegenerative diseases. *Zool Res* **45**, 263-274, doi:10.24272/j.issn.2095-8137.2023.197 (2024).
- 18 Chen, Y. *et al.* Generation of Cynomolgus Monkey Chimeric Fetuses using Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* **17**, 116-124, doi:10.1016/j.stem.2015.06.004 (2015).
- 19 Cao, J. *et al.* Live birth of chimeric monkey with high contribution from embryonic stem cells. *Cell* **186**, 4996-5014 e4924, doi:10.1016/j.cell.2023.10.005 (2023).
- 20 Gao, X. *et al.* Establishment of porcine and human expanded potential stem cells. *Nat Cell Biol* **21**, 687-699, doi:10.1038/s41556-019-0333-2 (2019).
- 21 Tapponnier, Y. *et al.* Reprogramming of rabbit induced pluripotent stem cells toward epiblast and chimeric competency using Kruppel-like factors. *Stem Cell Res* **24**, 106117, doi:10.1016/j.scr.2017.09.001 (2017).
- 22 Osteil, P. *et al.* Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naive pluripotency. *Biol Open* **2**, 613-628, doi:10.1242/bio.20134242 (2013).
- 23 Bayerl, J. *et al.* Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction. *Cell Stem Cell* **28**, 1–17, doi:10.1016/j.stem.2021.04.001 (2021).
- 24 Theunissen, T. W. *et al.* Systematic Identification of Culture Conditions for Induction and Maintenance of Naive Human Pluripotency. *Cell Stem Cell* **15**, 471-487, doi:10.1016/j.stem.2014.07.002 (2014).
- 25 Takashima, Y. *et al.* Resetting Transcription Factor Control Circuitry toward GroundState Pluripotency in Human. *Cell* **158**, 1254-1269, doi:10.1016/j.cell.2014.08.029 (2014).
- 26 Fang, R. *et al.* Generation of naive induced pluripotent stem cells from rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* **15**, 488-496, doi:10.1016/j.stem.2014.09.004 (2014).
- 27 Yang, Y. *et al.* Derivation of Pluripotent Stem Cells with In Vivo Embryonic and Extraembryonic Potency. *Cell* **169**, 243-257 e225, doi:10.1016/j.cell.2017.02.005 (2017).

- 28 Bouchereau, W. *et al.* Major transcriptomic, epigenetic and metabolic changes underlie the pluripotency continuum in rabbit preimplantation embryos. *Development* **149**, dev200538, doi:10.1242/dev.200538 (2022).
- 29 Chaumeil, J. *et al.* Evolution from XIST-independent to XIST-controlled X-chromosome inactivation: epigenetic modifications in distantly related mammals. *PLoS ONE* **6**, e19040, doi:10.1371/journal.pone.0019040 (2011).
- 30 Hotta, A. *et al.* Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nat Methods* **6**, 370-376, doi:10.1038/nmeth.1325 (2009).
- 31 Mangeot, P. E. *et al.* Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells. *J Virol* **74**, 8307-8315 (2000).
- 32 Silva, J. *et al.* Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* **138**, 722-737, doi:10.1016/j.cell.2009.07.039 (2009).
- 33 Stuart, H. T. *et al.* NANOG Amplifies STAT3 Activation and They Synergistically Induce the Naive Pluripotent Program. *Curr Biol* **24**, 340-346, doi:10.1016/j.cub.2013.12.040 (2014).
- 34 Guo, G. *et al.* Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* **136**, 1063-1069 (2009).
- 35 Jiang, J. *et al.* A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* **10**, 353-360 (2008).
- 36 Ema, M. *et al.* Kruppel-like factor 5 is essential for blastocyst development and the normal self-renewal of mouse ESCs. *Cell Stem Cell* **3**, 555-567 (2008).
- 37 Parisi, S. *et al.* Klf5 is involved in self-renewal of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* **121**, 2629-2634 (2008).
- 38 Nagamatsu, G. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Primordial Germ Cells by Single Reprogramming Factors. *Stem Cells* **31**, 479-487, doi:10.1002/stem.1303 (2012).
- 39 Bourillot, P. Y. *et al.* Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells* **27**, 1760-1771, doi:10.1002/stem.110 (2009).
- 40 Uranishi, K., Akagi, T., Sun, C., Koide, H. & Yokota, T. Dax1 Associates with Esrrb and Regulates Its Function in Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol* **33**, 2056-2066, doi:10.1128/MCB.01520-12 (2013).
- 41 Tai, C. I. & Ying, Q. L. Gbx2, a LIF/Stat3 target, promotes reprogramming to and retention of the pluripotent ground state. *J Cell Sci* **126**, 1093-1098, doi:10.1242/jcs.118273 (2013).
- 42 Qiu, D. *et al.* Klf2 and Tfcp2l1, Two Wnt/beta-Catenin Targets, Act Synergistically to Induce and Maintain Naive Pluripotency. *Stem cell reports* **5**, 314-322, doi:10.1016/j.stemcr.2015.07.014 (2015).

- 43 Martello, G., Bertone, P. & Smith, A. Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *EMBO J* **32**, 2561-2574, doi:10.1038/emboj.2013.177 (2013).
- 44 Festuccia, N., Owens, N., Chervova, A., Dubois, A. & Navarro, P. The combined action of Esrrb and Nr5a2 is essential for murine naive pluripotency. *Development* **148**, dev199604, doi:10.1242/dev.199604 (2021).
- 45 Guo, G. & Smith, A. A genome-wide screen in EpiSCs identifies Nr5a nuclear receptors as potent inducers of ground state pluripotency. *Development* **137**, 3185-3192, doi:10.1242/dev.052753 (2010).
- 46 Lee, Y. H. *et al.* Protein arginine methyltransferase 6 regulates embryonic stem cell identity. *Stem Cells Dev* **21**, 2613-2622, doi:10.1089/scd.2011.0330 (2012).
- 47 Cartwright, P. *et al.* LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* **132**, 885-896 (2005).
- 48 Han, J. *et al.* Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells. *Nature* **463**, 1096–1100, doi:10.1038/nature08735 (2010).
- 49 Pastor, W. A. *et al.* TFAP2C regulates transcription in human naive pluripotency by opening enhancers. *Nat Cell Biol* **20**, 553-564, doi:10.1038/s41556-018-0089-0 (2018).
- 50 Lea, R. A. *et al.* KLF17 promotes human naive pluripotency but is not required for its establishment. *Development* **148**, dev199378, doi:10.1242/dev.199378 (2021).
- 51 Collier, A. J. *et al.* Comprehensive Cell Surface Protein Profiling Identifies Specific Markers of Human Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell* **20**, 874-890, doi:10.1016/j.stem.2017.02.014 (2017).
- 52 Trusler, O., Huang, Z., Goodwin, J. & Laslett, A. L. Cell surface markers for the identification and study of human naive pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* **26**, 36-43, doi:10.1016/j.scr.2017.11.017 (2018).
- 53 Takahashi, K., Mitsui, K. & Yamanaka, S. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* **423**, 541-545 (2003).
- 54 Banaszynski, L. A., Chen, L. C., Maynard-Smith, L. A., Ooi, A. G. & Wandless, T. J. A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell* **126**, 995-1004, doi:10.1016/j.cell.2006.07.025 (2006).
- 55 Hall, J. *et al.* Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* **5**, 597-609, doi:10.1016/j.stem.2009.11.003 (2009).
- 56 Yeo, J. C. *et al.* Klf2 Is an Essential Factor that Sustains Ground State Pluripotency. *Cell Stem Cell* **14**, 864-872, doi:10.1016/j.stem.2014.04.015 (2014).
- 57 Jeon, H. *et al.* Comprehensive Identification of Kruppel-Like Factor Family Members Contributing to the Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells and Cellular Reprogramming. *PLoS ONE* **11**, e0150715, doi:10.1371/journal.pone.0150715 (2016).

- 58 Yamane, M., Ohtsuka, S., Matsuura, K., Nakamura, A. & Niwa, H. Overlapping functions of Kruppel-like factor family members: targeting multiple transcription factors to maintain the naive pluripotency of mouse embryonic stem cells. *Development* **145**, dev162404, doi:10.1242/dev.162404 (2018).
- 59 Dunn, S. J., Li, M. A., Carbognin, E., Smith, A. & Martello, G. A common molecular logic determines embryonic stem cell self-renewal and reprogramming. *EMBO J* **38**, doi:10.15252/embj.2018100003 (2018).
- 60 Hanna, J. *et al.* Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 92229227, doi:10.1073/pnas.1004584107 (2010).
- 61 Veland, N. *et al.* The Arginine Methyltransferase PRMT6 Regulates DNA Methylation and Contributes to Global DNA Hypomethylation in Cancer. *Cell reports* **21**, 33903397, doi:10.1016/j.celrep.2017.11.082 (2017).
- 62 Wang, X. *et al.* Suppression of PRMT6-mediated arginine methylation of p16 protein potentiates its ability to arrest A549 cell proliferation. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 23332341, doi:10.1016/j.biocel.2012.09.015 (2012).
- 63 Tang, J., Meng, Q., Shi, R. & Xu, Y. PRMT6 serves an oncogenic role in lung adenocarcinoma via regulating p18. *Mol Med Rep* **22**, 3161-3172, doi:10.3892/mmr.2020.11402 (2020).
- 64 Bao, J. *et al.* Mouse Models of Overexpression Reveal Distinct Oncogenic Roles for Different Type I Protein Arginine Methyltransferases. *Cancer Res* **79**, 21-32, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1995 (2019).
- 65 Kleinschmidt, M. A., de Graaf, P., van Teeffelen, H. A. & Timmers, H. T. Cell cycle regulation by the PRMT6 arginine methyltransferase through repression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *PLoS ONE* **7**, e41446, doi:10.1371/journal.pone.0041446 (2012).
- 66 Kim, H. S. *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-3 induces G1 cell cycle arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase 2 and 4 in MCF-7 human breast cancer cells. *Horm Metab Res* **42**, 165-172, doi:10.1055/s-0029-1243190 (2010).
- 67 Kim, N. H., Kim, S. N., Seo, D. W., Han, J. W. & Kim, Y. K. PRMT6 overexpression upregulates TSP-1 and downregulates MMPs: its implication in motility and invasion. *Biochem Biophys Res Commun* **432**, 60-65, doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.085 (2013).
- 68 Takahashi, K., Murakami, M. & Yamanaka, S. Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. *Biochem Soc Trans* **33**, 1522-1525 (2005).
- 69 Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N. & Hanna, J. H. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 155169, doi:10.1038/nrm.2015.28 (2016).
- 70 Qin, H. *et al.* YAP Induces Human Naive Pluripotency. *Cell reports* **14**, 2301-2312, doi:10.1016/j.celrep.2016.02.036 (2016).

- 71 Shi, J., Farzaneh, M. & Khoshnam, S. E. Yes-Associated Protein and PDZ Binding Motif: A Critical Signaling Pathway in the Control of Human Pluripotent Stem Cells Self-Renewal and Differentiation. *Cell Reprogram* **22**, 55-61, doi:10.1089/cell.2019.0084 (2020).
- 72 Arora, S., Scott, A. M. & Janes, P. W. Eph Receptors in Cancer. *Biomedicines* **11**, 315, doi:10.3390/biomedicines11020315 (2023).
- 73 Kania, A. & Klein, R. Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 240-256, doi:10.1038/nrm.2015.16 (2016).
- 74 Tang, S. *et al.* Methionine metabolism is essential for SIRT1-regulated mouse embryonic stem cell maintenance and embryonic development. *EMBO J* **36**, 3175-3193, doi:10.15252/embj.201796708 (2017).
- 75 Wang, J. *et al.* Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism. *Science* **325**, 435-439, doi:10.1126/science.1173288 (2009).
- 76 Shiraki, N. *et al.* Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell metabolism* **19**, 780-794, doi:10.1016/j.cmet.2014.03.017 (2014).
- 77 Wang, J., Alexander, P. & McKnight, S. L. Metabolic specialization of mouse embryonic stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **76**, 183-193, doi:10.1101/sqb.2011.76.010835 (2011).
- 78 Shyh-Chang, N. *et al.* Influence of threonine metabolism on S-adenosylmethionine and histone methylation. *Science* **339**, 222-226, doi:10.1126/science.1226603 (2013).
- 79 Negre, D. *et al.* Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther* **7**, 1613-1623 (2000).
- 80 Rival-Gervier, S. *et al.* Kinetics and epigenetics of retroviral silencing in mouse embryonic stem cells defined by deletion of the D4Z4 element. *Mol Ther* **21**, 1536-1550, doi:10.1038/mt.2013.131 (2013).
- 81 Theunissen, T. W. *et al.* Nanog Overcomes Reprogramming Barriers and Induces Pluripotency in Minimal Conditions. *Curr Biol* **21**, 65-71, doi:S0960-9822(10)01584-8 [pii] 10.1016/j.cub.2010.11.074 (2011).
- 82 Wang, W. *et al.* Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9290-9295, doi:10.1073/pnas.0801017105 (2008).
- 83 Teixeira, M. *et al.* Rapid cooling of rabbit embryos in a synthetic medium. *Cryobiology* **85**, 113-119, doi:10.1016/j.cryobiol.2018.07.006 (2018).
- 84 Besenfelder, U., Strouhal, C. & Brem, G. A method for endoscopic embryo collection and transfer in the rabbit. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A* **45**, 577-579 (1998).
- 85 Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682, doi:10.1038/nmeth.2019 (2012).

- 86 Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550, doi:10.1186/s13059014-0550-8 (2014).
- 87 Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC bioinformatics* **14**, 128, doi:10.1186/1471-2105-14-128 (2013).
- 88 Postma, M. & Goedhart, J. PlotsOfData-A web app for visualizing data together with their summaries. *PLoS Biol* **17**, e3000202, doi:10.1371/journal.pbio.3000202 (2019).

Table 1: Results of embryo injections with KEPi_VAL_CD75^{high} cells and transferred to foster mothers.

	Embryos injected	Embryos transferred	Fetuses Day10	Stillborn	Newborns sacrificed	Newborns alive	Chimeric		
							Fluo	PCR	%
<i>Exp #1</i>	92	80	13				1	N.D.	
<i>Exp #2</i>	156	144	25				4	15/18	83
<i>Exp #3</i>	60	48				1	1	1	
<i>Exp #4</i>	60	48				2	1	2	
<i>Exp #5</i>	73	60		1	1		2	2	100
<i>Exp #6</i>	80	64		1	4	3	6	8	

N.D. = Not Determined

Figure titles and legends

Figure 1: A novel culture regimen and reporter cell line for naïve pluripotency in rabbit. (a) Experimental scheme of B19_VAL, B19_VAL_14d, NaiveRep_KF and NaiveRep_VAL cell line generation. (b) Immunostaining of SOX2, OCT4, DPPA5, OOEP, 5mC, H3K9me3, H3K14Ac, H3K4me3, and H3K27me3 in B19 cells before (_KF) and after (_VAL) switching to VALGÖX culture medium. Violin plots represent the distribution of fluorescence intensities. Welch's unequal variances t-test was performed to compare KF and VAL conditions. A difference is considered significant (***) if difference between sample means is greater than 10% and the p-value less than $1e-10$. Scale bars: 50 μm for immunostainings, 100 μm for phase contrast. (c) Heatmap representation of differentially expressed genes between B19_KF and B19_VAL cells. (d) Phase contrast images of B19 cells 48h (_VAL) and 14 days (_VAL_14d) after switching to VALGÖX culture medium. Scale bars: 200 μm . (e) Heatmap representation of differentially expressed genes between B19_VAL and B19_VAL_14d cells. (f) Phase contrast and epifluorescence images of NaiveRep_KF and NaiveRep_VAL cells. Scale bars: 100 μm . (g) Flow cytometry analysis of parental B19_KF (control iPSC), NaiveRep_KF and NaiveRep_VAL showing blue and red fluorescence associated with EOS-tagBFP and DDPA2mKO2, respectively.

Figure 2: cDNA library screening. (a) Experimental scheme with four different screening conditions. (b) Flow cytometry analysis of EOS-tagBFP and DDPA2-mKO2 expression in 27 NaiveRep_KF cell lines. (c) Genomic PCR analysis showing proviral integrations in 27 NaiveRep_KF cell lines. (d) Flow cytometry analysis of EOS-tagBFP and DDPA2-mKO2 expression in 14 NaiveRep_FCS+LIF cell lines. (e) Flow cytometry analysis of EOS-tagBFP and DDPA2-mKO2 expression in three NaiveRep_KOSR+LIF cell lines. (f) Genomic PCR analysis showing proviral integrations in the 14 NaiveRep_FCS+LIF cell lines and three NaiveRep_KOSR+LIF cell lines. (g) Flow cytometry analysis of EOS-tagBFP and DDPA2mKO2 expression in 32 NaiveRep_VALGÖX cell lines. (h) Genomic PCR analysis showing the cDNAs found in 21 of the 32 NaiveRep_VALGÖX cell lines. (i) Immunostaining of H2AK119Ub and H3K27me3 histone marks in four NaiveRep_VALGÖX cell lines. Scale bars, 20 μm . (j) Histograms of the percentage of cells with H2AK119Ub and H3K27me3 nuclear foci in four NaiveRep_VALGÖX cell lines and NaiveRep_KF control cells (T-test compared to control cells: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Figure 3: Stabilization of a naïve-like pluripotent state with KLF2/ERAS/PRMT6 gene cocktail. (a) Phase contrast and confocal images of B19_VAL before and after single, double, and triple transfection with PiggyBac plasmids expressing KLF2-V5 (K), HA-ERAS (E), and flag-PRMT6 (P). Immunostainings with CD75, H3K27me3 and H2AK119Ub antibodies are displayed. Scale bars:

phase contrast, 100 μ m; CD75, 50 μ m; histone modifications, 20 μ m. **(b)** Graphical representation of the number of cells displaying fluorescence intensities between 0 and 200 (arbitrary units) after immunostaining of CD75. **(c)** Percentage of cells exhibiting H3K27me3 and H2AK119Ub nuclear foci in control, single-, double-, and triple-transfected cell populations. **(d)** Immunostaining of KEP_VAL cells with CD75 and H3K27me3 antibodies. Scale bar: 40 μ m. **(e)** Experimental design for generating KEPc_KF and KEPc_VAL cell lines. **(f)** Phase contrast and confocal images of KLF2-V5, HA-ERAS, flag-PRMT6, H3R2me2/3, H3K27me3, and H2AK119Ub in control B19_KF, KEPc#37_KF, and KEPc#37_VAL cells. Scale bars: phase contrast, 100 μ m; immunostainings, 30 μ m. **(g)** Percentage of cells containing H3K27me3 and H2AK119Ub nuclear foci in control parental B19 iPSCs, KEPc_KF, and KEPc_VAL cell lines (T-test comparison of KF and VAL conditions: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). **(h)** Two-dimensional PCA of the transcriptomic data obtained from five cell populations (B19, KEPc#37, KEPc#39, KEPc#42, KEPc#44) into two media (Square, KF; Circle, VALGöX) as indicated (three biological replicates). **(i)** Histograms illustrating gene expression in B19_KF, B19_VAL, KEPc_KF, and KEPc_VAL cell lines (based on RNA-seq data). **(j)** Heatmap representation of differentially expressed genes between B19_KF, KEPc#37_VAL, KEPc#39_VAL, KEPc#42_VAL, and KEPc#44_VAL cells (genes are selected from the list of 80 differentially expressed genes between inner cell mass (E3.5), early epiblast (E4.0), mid-epiblast (E5.0) and late epiblast (E6.0-E6.6) of rabbit embryos²⁸).

Figure 4: Colonization of rabbit embryos by iPSCs overexpressing KLF2, ERAS and PRMT6. **(a)** Confocal images of late-blastocyst-stage rabbit embryos (E5.0, 3DIV) acquired after the microinjection of B19_KF, KEPc#37_KF, KEPc#37_VAL, KEPc#44_KF, and KEPc#44_VAL cells into early morula-stage (E2.8) embryos (scale bars: 50 μ M). On the right part of the panel, a single line has been drawn through the ICM of the embryos for further intensity profile measurement using Fiji. The resulting fluorescence intensity plot profile across multiple channels (green for GFP signal, purple for SOX2 signal) demonstrates that GFP cells are also SOX2⁺. **(b)** Percentage of rabbit embryos with GFP⁺ cells and the distribution according to GFP⁺ cell number among GFP⁺ embryo.

Figure 5: Design of a reversible KEP expression system for *in vivo* studies. **(a)** Experimental scheme of KEPi_VAL+S and KEPi_VAL+S-S cell line generation. **(b)** Expression of KLF2V5 and HA-ERAS analyzed through Western blotting in KEPi#13, KEPi#18, KEPi#28, and KEPi#36 cells before and after withdrawal of Shield1. **(c)** Two-dimensional PCA of the transcriptome of the indicated cell lines (three biological replicates). **(d)** Volcano plot representation of DEGs between KEPi_VAL+S and KEPi_VAL+S-S cells. **(e)** Confocal images of late-blastocyst-stage rabbit embryos (E5.0, 3DIV) acquired after microinjection of KEPi_VAL+S and KEPi_VAL+S-S cells into morula-stage (E2.8) embryos (scale bars: 50 μ M). **(f)** Percentage of embryos with GFP⁺ cells for each cell line. **(g)** Distribution of embryos according to GFP⁺ cell numbers for

each cell line. (h) Distribution of embryos according to GFP⁺/SOX2⁺ cell numbers for each cell line.

Figure 6: Chimerism induced by KEP_VAL_CD75^{high} cells in rabbit fetuses. (a) Experimental scheme of CD75^{high} cell subpopulation analysis. (b) Flow cytometry analysis of KEP#13_VAL+S and KEP#28_VAL+S cells showing the FACS-sorted cells. (c) Confocal images of late-blastocyst-stage rabbit embryos (E5.0, 3 DIV) acquired after microinjection of KEPi#13_CD75^{high} and KEPi#28_CD75^{high} cells into morula-stage (E2.8) embryos (scale bars: 50 μm). (d) Percentage of embryos with GFP⁺ cells for each cell line. (e) Percentage of embryos with > 20 GFP⁺ cells for each cell line. (f) Chimeric fetus collected at E10.5. (g) Confocal images of sections from a E10.5 chimeric fetus showing GFP⁺ cells in the neural tube (colabeled with TUJ1 and SOX2), in the heart (co-labeled with SMA), and in the somites (colabeled with PAX3).

Figure 7: Chimerism induced by KEP_VAL_CD75^{high} cells in newborn rabbits. (a) Gel electrophoresis of PCR fragments following amplification of a GFP DNA sequence from genomic DNA extracted from various organs of a stillborn pup. (b) Whole stillborn pup photographed under UV light. (c) Piece of skin photographed under UV light. (d) Confocal microscopy images showing GFP⁺ cells in sections from a newborn chimera sacrificed one day post-birth. (e) Gel electrophoresis of PCR fragments from the amplification of GFP DNA sequences in genomic DNA extracted from the blood of six viable animals. (f) Gel electrophoresis of PCR fragments from the amplification of GFP DNA sequences in genomic DNA extracted from buccal cells of six viable animals. (g) Noses and ears of two young rabbits, a control and chimeric rabbit #1, photographed under bright and UV lights. the list of up- and down-regulated DEGs between B19_VAL and KEPi_VAL+S.

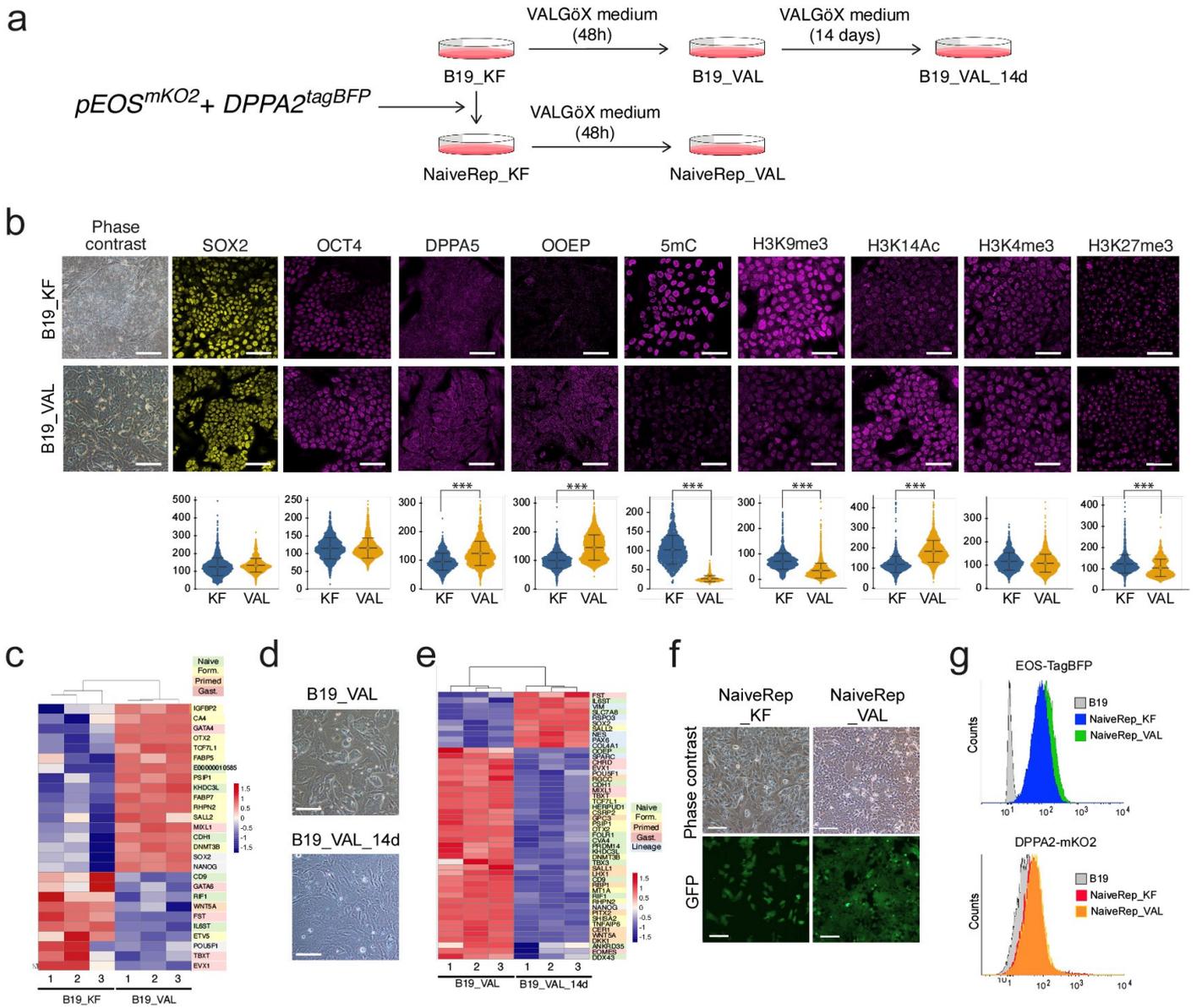


Figure 1

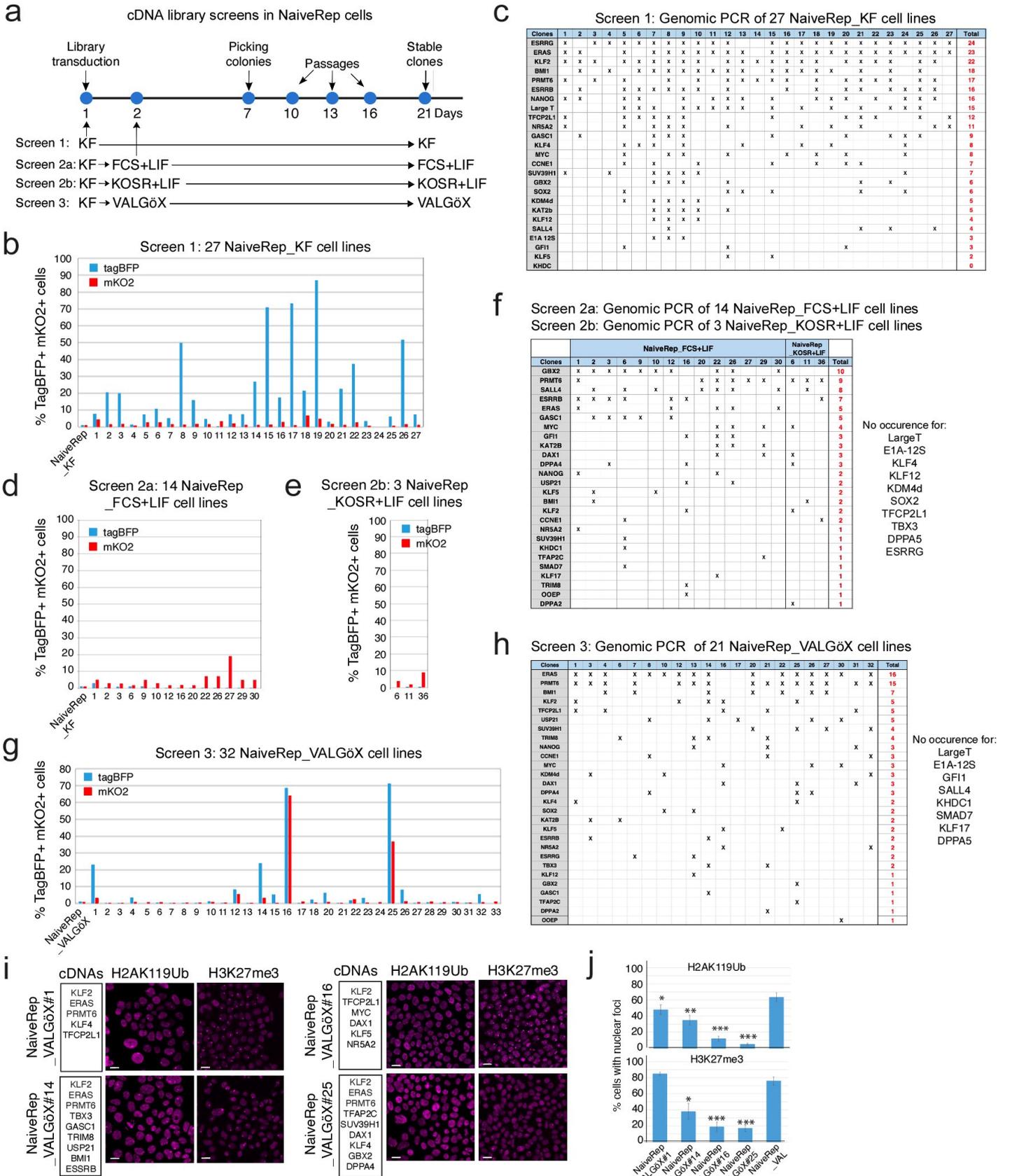


Figure 2

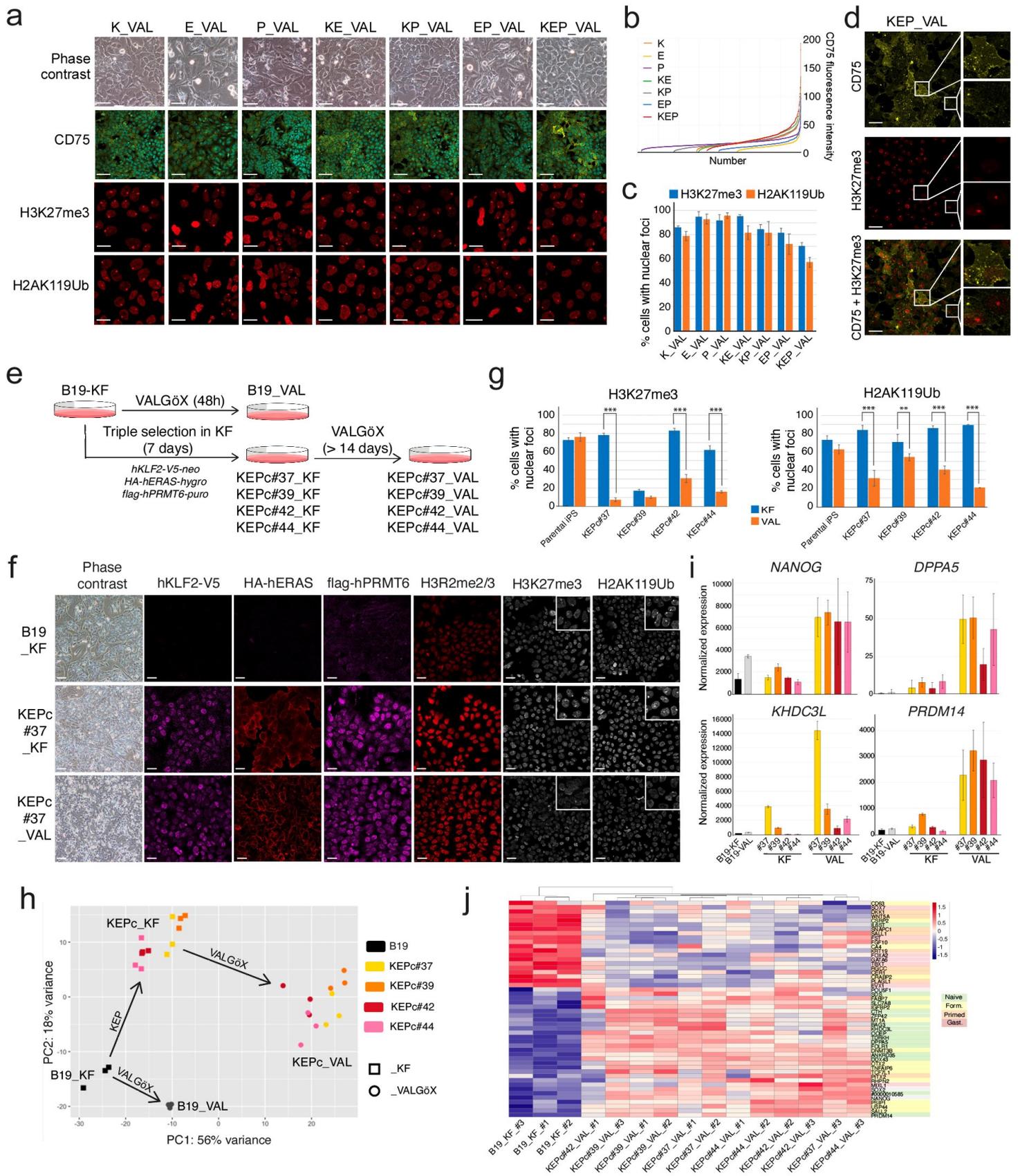


Figure 3

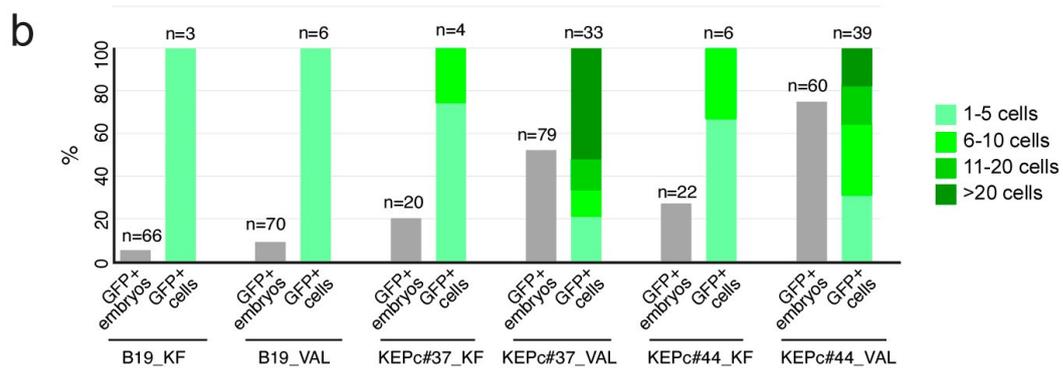
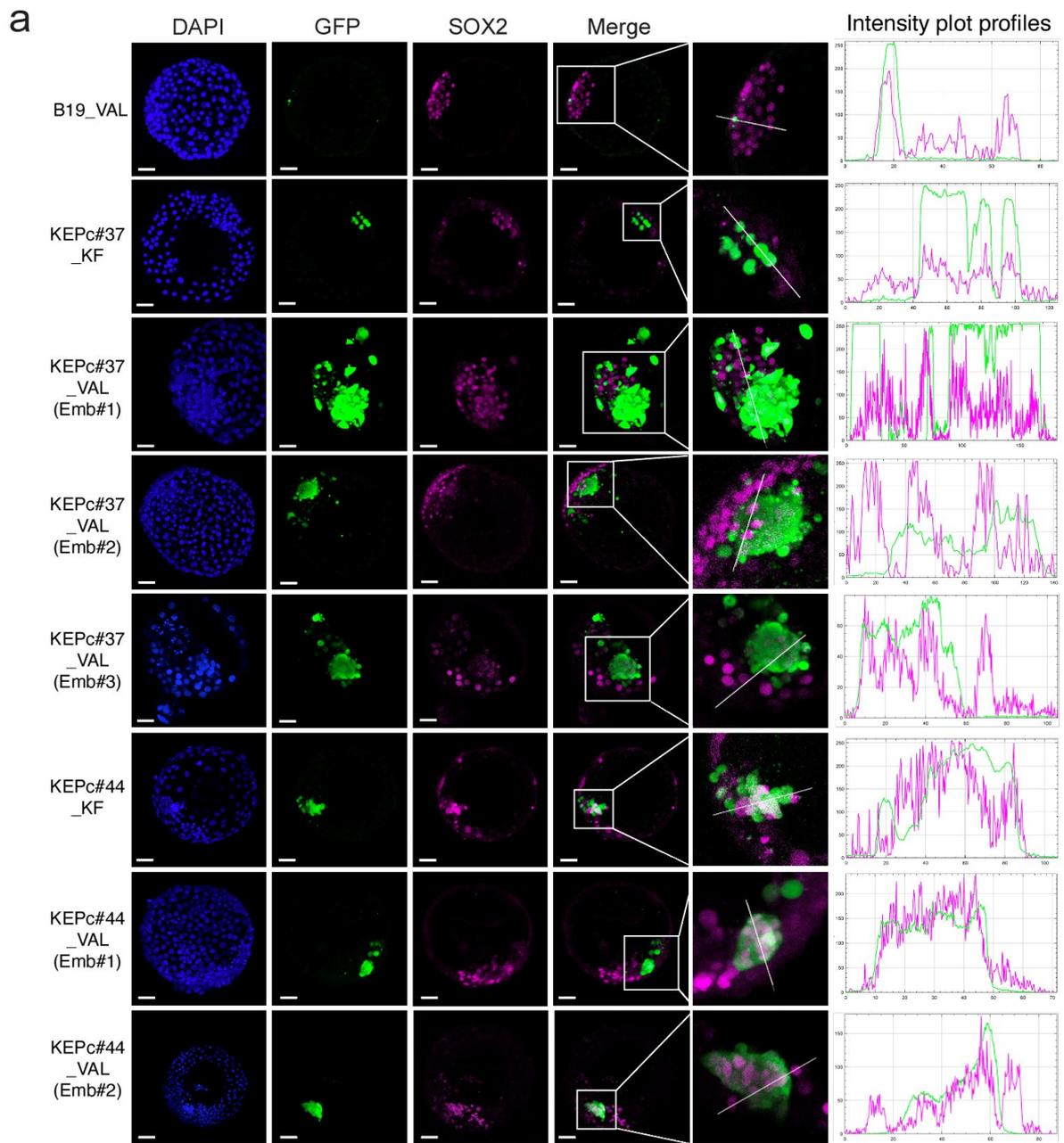


Figure 4

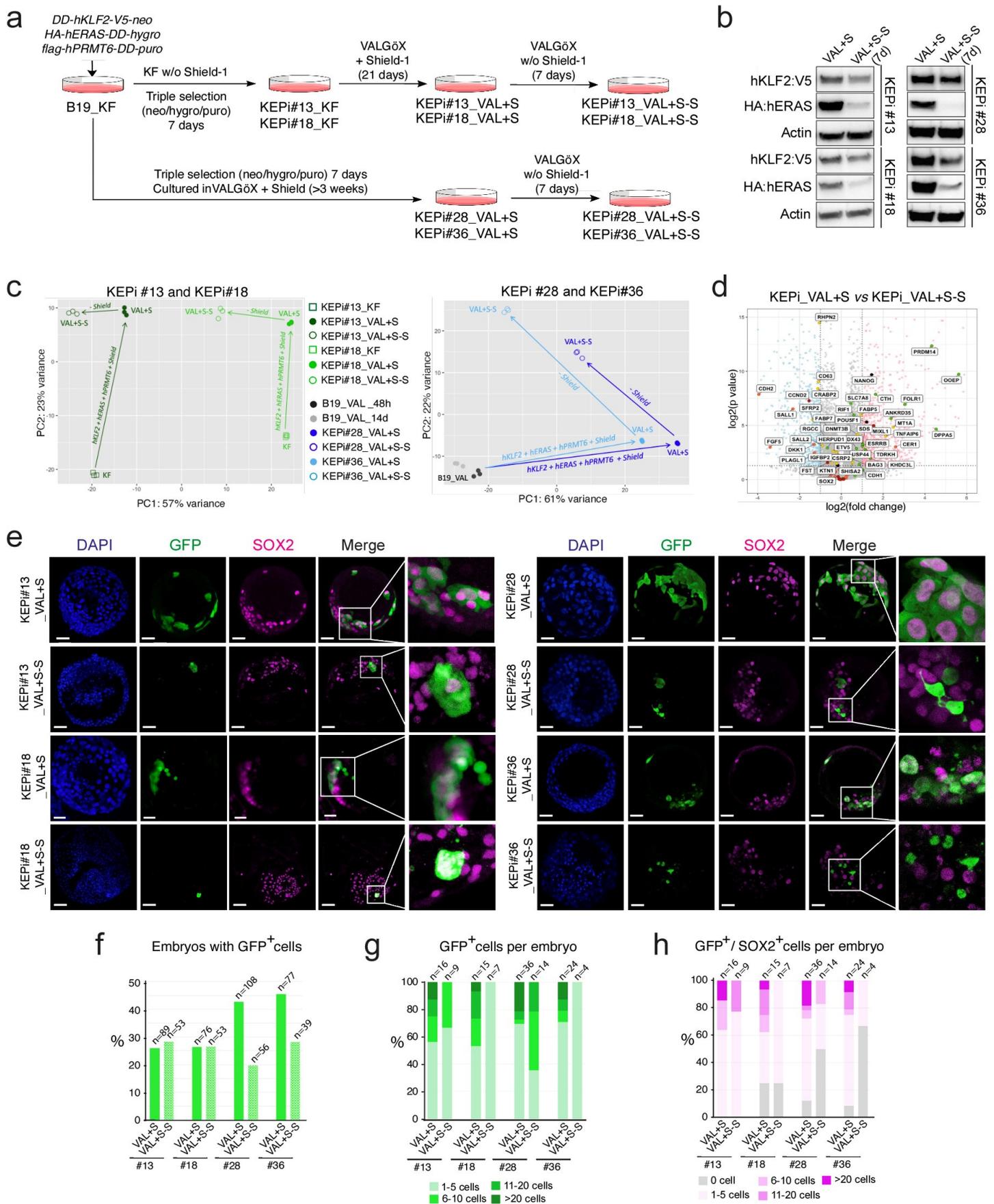


Figure 5

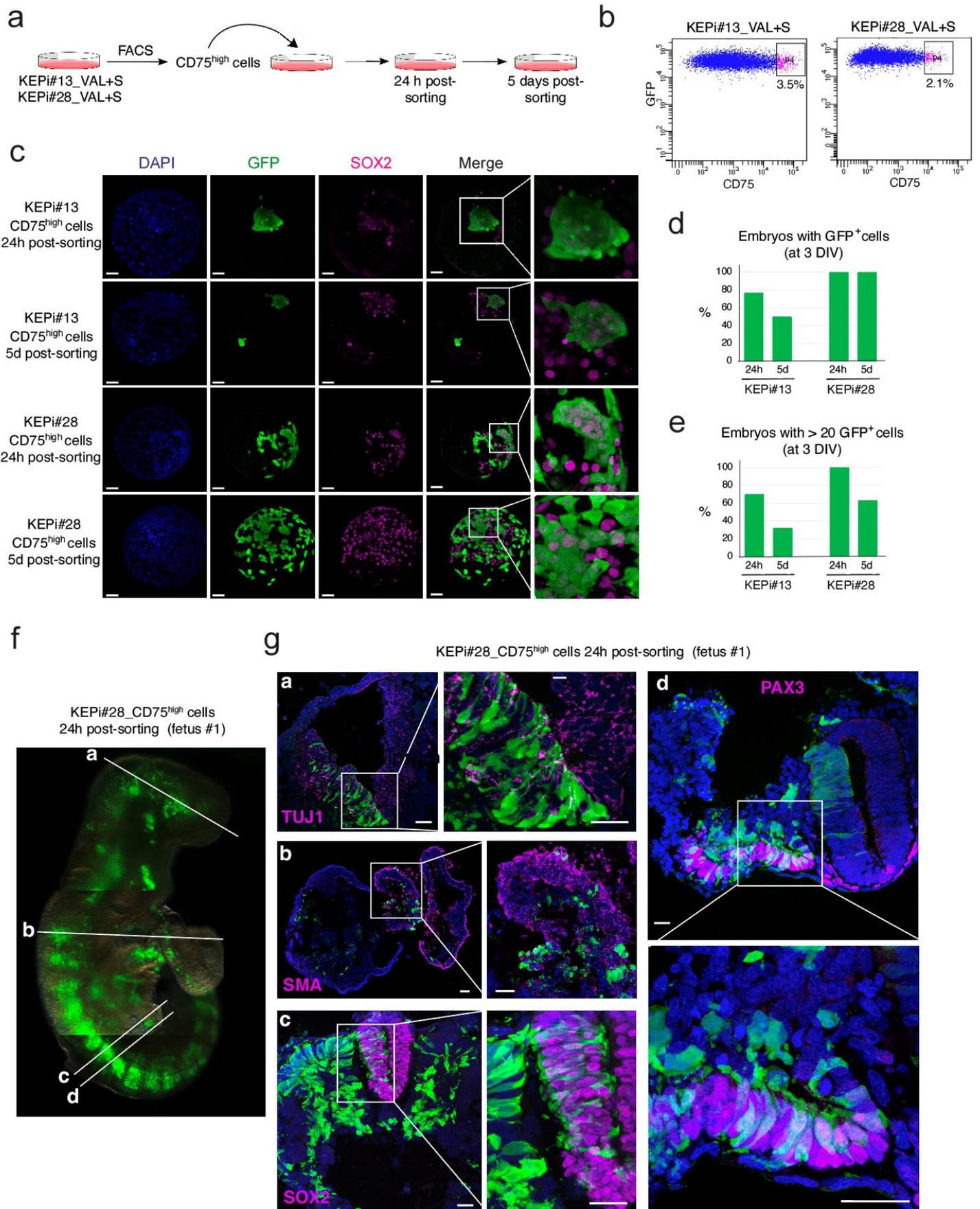


Figure 6

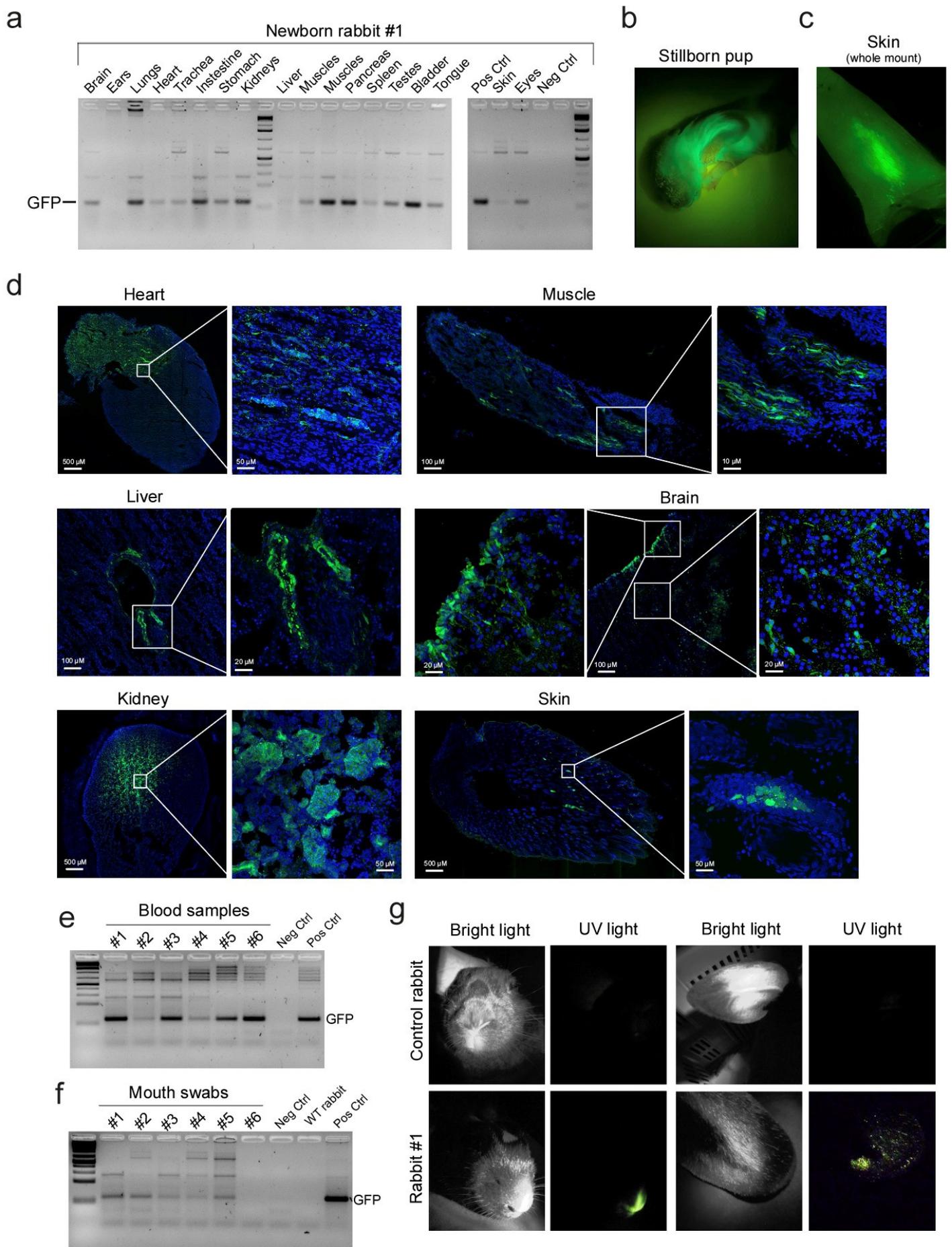


Figure 7

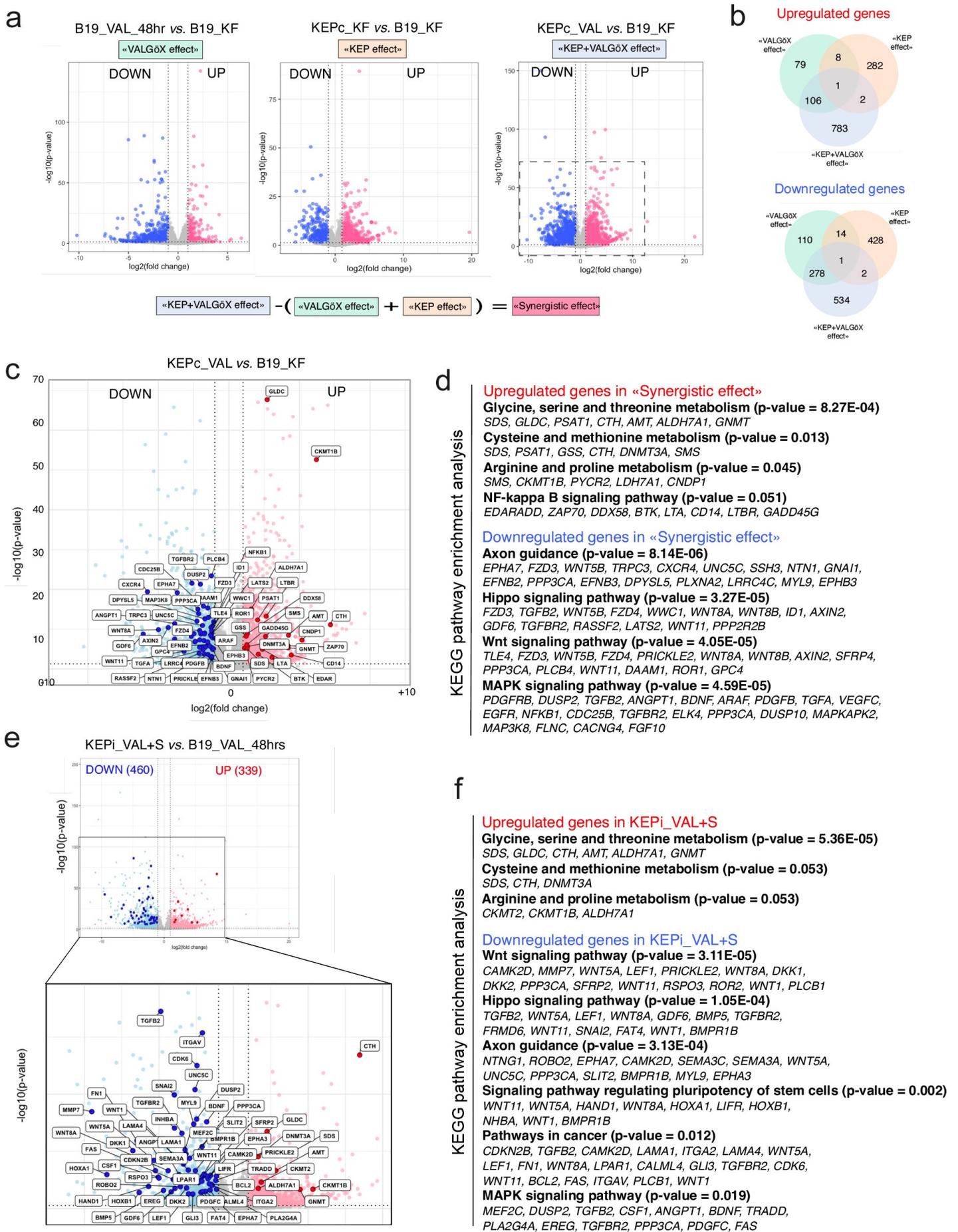


Figure 8

Supplementary information

Figure S1: Design of a novel culture regimen and reporter cell line for naïve pluripotency. (a) Phase contrast pictures of control B19 cells grown in KOSR+FGF (KF), and same cells after culture in naïve media (*e.g.* HENSM, LCDM, t2iLGöY, 5iLA, and 4i/L/b) for two weeks. Scale bars, 100µm. (b) Immunostaining of H3K27me3 and H2AK119Ub histone marks in B19_KF and B19_VAL cells. (c) Histograms of percentage of cells with H3K27me3 and H2AK119Ub nuclear foci in B19_KF and B19_VAL_48h cultures (T-test was not significant). Scale bars, 30µm. (d) Immunostaining of GFP and SOX2 in late-blastocyst-stage rabbit embryos (E5.0, 3DIV) after microinjection of B19_KF and B19_VAL cells into morula-stage (E2.8) embryos. Scale bars, 50µm. Table showing for each cell line the numbers of injected morula, blastocysts with GFP⁺ cells, GFP⁺ cells per embryo, and GFP⁺/SOX2⁺ cells per embryo. (e) Violin plot representation of *SOX2*, *NANOG* and *DPPA2* expression analyzed by single-cell RNA sequencing [from ²⁸]; E, embryonic day; ICM, inner cell mass; EPI, epiblast; EPIant, anterior epiblast; PE, primitive endoderm; TE, trophectoderm. (f) Strategy used for the insertion of mKO2 in the *DPPA2* locus of B19_KF cells expressing GFP using Crispr/Cas9. (g) Structure of the EOS-TagBFP PiggyBac expression vector used to obtain NaiveRep_KF cells.

Figure S2: cDNA library screening. (a) Heatmap representation of the expression in the rabbit embryo of the 29 genes included in the cDNA library. ICM, inner cell mass; E, embryonic day; EPI, epiblast; EPIant, anterior epiblast; PE, primitive endoderm; TE, trophectoderm. (b) Estimation of relative lentivirus titers by detection of proviral DNA using genomic PCR in B19_KF cells transduced with each of the 25 corresponding lentiviruses at the indicated dilution. (c) Flow cytometry analysis of B19_KF cells transduced with four lentiviral vectors, each expressing a reporter fluorescent protein (*i.e.* GFP, mKO2, tagBFP, and Katushka) at multiplicities of infection (MOI) of 10, 20 and 50 (1:1:1:1 ratio). (d) Percentage of B19_KF cells transduced with each one of the four reporter lentiviruses and with all. (e) Phase contrast and tagBFP/mKO2 epifluorescence images of NaiveRep_VALGöX cell lines. Scale bars, 50 µm. (f) Growth curves of NaiveRep_KF and NaiveRep_VALGöX cell lines. (g) Negative correlation between percentage of cells with nuclear foci and percentage of cells expressing EOS-tagBFP in NaiveRep_VALGöX cell lines.

Figure S3: Characterization of KEPC cells (a) Confocal imaging of B19_VAL before and after single, double, and triple transfection with PiggyBac plasmids expressing KLF2-V5 (K), HA-ERAS (E), and flag-PRMT6 (P). Immunostaining with anti-V5 (KLF2), anti-HA (ERAS), and anti-Flag (PRMT6) antibodies is shown. Scale bars, 40 µm. (b) Percentage of differentiated cells in control, single-, double-, and triple-transfected cell populations, based on fluorescence patterns (diffuse vs punctate) observed after immunostaining of H3K27me3. (c) Confocal imaging of KLF2-V5, HA-ERAS, Flag-PRMT6, H3R2me2/3, H3K27me3, and H2AK119Ub

immunostaining in control B19_VAL, KEPc#39, KEPc#42, and KEPc#44 cells cultured in _KF and _VAL conditions. Scale bars, 30 μm . **(d)** Western blot analysis of AKT and Ph-AKT expression in B19_KF and KEPc#37_KF cells. **(e)** Volcano plot representation of differentially expressed genes between B19_KF and all KEPc_VAL cell lines. **(f)** Histograms of normalized gene expression in B19_KF, B19_VAL_48h, KEPc_KF, and KEPc_VAL cell lines (from RNA-seq data).

Figure S4: Colonization of rabbit embryos by KEPc cells. Epifluorescence images (with phase contrast and GFP signals merged) of rabbit blastocysts colonized by B19_VAL, KEPc#37, and KEPc#44 cells, after 3 DIV *in vitro*. Scale bar: 200 μm .

Figure S5: Characterization of KEPi cells. **(a)** Confocal imaging of KLF2-V5, HA-ERAS, flag-PRMT6, H3R2me2/3, and H2AK119Ub immunostaining in KEPc#13_VAL+S, KEPc#13_VAL+S-S, KEPc#18_VAL+S, and KEPc#18_VAL+S-S cells. Scale bars: phase contrast, 100 μm ; immunofluorescence images, 30 μm . **(b)** Histograms of the percentage of cells with H2AK119Ub nuclear foci in B19_VAL, KEPc#13_VAL+S, KEPc#13_VAL+S-S, KEPc#18_VAL+S, and KEPc#18_VAL+S-S cells (Welch's unequal variances t-test; ns, nonsignificant). **(c)** Western blot analysis of AKT and Ph-AKT expression in B19_VAL, KEPc#13_VAL+S, KEPc#13_VAL+S-S, KEPc#18_VAL+S, and KEPc#18_VAL+S-S cells (with ACTIN expression as a control). **(d)** Histogram representation of AKT and Ph-AKT levels in KEPi# cells (+S and +S-S conditions) after normalization to ACTIN and to AKT/PhAKT levels measured in B19_VAL cells. Quantification and normalization of the Western blot bands was performed with Fiji software using Gel Analyzer macro. **(e)** Histogram representation of the normalized expression levels of selected genes in B19_VAL_48h, B19_VAL_14d, KEPi#_VAL+S, and KEPi#_VAL+S-S cells (from RNA-seq data).

Figure S6: Colonization of rabbit embryos and fetuses by KEPi_CD75^{high} cells. **(a)** Optical Z-section series (every 10 μm) of immunofluorescence confocal images from a late-blastocyststage rabbit embryo (E5.0, 3 DIV) acquired after the microinjection of KEPi#28_CD75^{high} cells into morula-stage (E2.8) embryos (scale bars: 50 μm). **(b)** Chimeric fetus (#3) collected at E10.5, showing high contribution of KEPi#28_CD75^{high} cell-derivatives in the amnion, surface ectoderm, and gut epithelium (co-labeled with LAMININ). Scale bar, 20 μm . **(c)** Chimeric fetus (#4) collected at E10.5, showing high contribution of KEPi#28_CD75^{high} cell-derivatives in the gut epithelium (co-labeled with CD31 and SOX17), and cardiac cells (co-labeled with DESMIN). Scale bar, 20 μm . **(d)** Gel electrophoresis of PCR fragments following amplification of a GFP DNA sequence from genomic DNA extracted from E10.5 fetuses (#1 to #18) and placentas (PL#1, PL#2), with DNA of white type rabbit as negative control and DNA of a plasmid carrying *GFP*.

Figure S7: Contribution of KEPI_CD75^{high} cells to organ development in newborns. (a) Gel electrophoresis of PCR fragments after amplification of a GFP DNA sequence from genomic DNA extracted from organs of newborns (stillborn or sacrificed), with DNA of white type rabbit as negative control and DNA of a plasmid carrying GFP gene. (b) Nose, ear and tail of a young chimeric male (#4), photographed under bright and UV lights.

Figure S8: Transcriptome characterization of KEPc cells. Histogram representation of the normalized expression levels of selected genes in B19_KF, B19_VAL_48h, KEPc_KF, and KEPc_VAL cells (from RNA-seq data). These genes include:

- MAPK signaling pathways: receptor-encoding genes *PDGFRB* and *EGFR*; signaling molecule-encoding genes *MAP3K8* and *MAPKAPK2*; MAPK phosphatase-encoding gene *DUSP2*; and the ERK/p38-target gene *ELK4*.
- WNT signaling pathways: WNT ligand and modulator-encoding genes *WNT5B* and *GPC4*, their receptor-encoding genes *FZD3/4*, and adaptor-encoding genes *PRICKLE2*, *AXIN2*, and *DAAM1*; and *PPP3CA*, encoding calcineurin A involved in the non-canonical WNT/Ca²⁺ signaling pathway.
- Axon guidance: *EFNB2* encoding Ephrin-B2; *EPHB1* and *EPHA4* encoding EPH-related receptors; *NTN1* encoding Netrin-1, and *PLXNA2* encoding Plexin A2.
- HIPPO signaling pathway: *WWTR1/TAZ*, *WWC1/KIBRA*, *LATS2*, and *PPP2R2B*, encoding upstream regulators of YAP/TAZ activity; *TEAD1* and *TEAD4*, two target genes of HIPPO signaling.
- Amino acid metabolism: *SDS* (serine dehydratase), *CTH* (cystathionine g-lyase), *GLDC* (glycine decarboxylase), *PSAT1* (phosphoserine aminotransferase), *AMT* (aminomethyltransferase), *ALDH7A1/8A1* (aldehyde dehydrogenase 7A1 and 8A1), *GNMT* (glycine N-methyltransferase), *CNDP1* (carnosine dipeptidase 1), *CKMT1B* (creatine kinase mitochondrial 1B), *ACYP1* (Acylphosphatase 1), and *PYCR2* (pyrroline-5-carboxylate reductase 2). All these genes are coding for enzymes regulating serine, glycine, lysine, cysteine, alanine, arginine, methionine, proline, tryptophane, and glutamate homeostasis, as well as processes like pyruvate production (*SDS*), one-carbon metabolism (*SDS*, *GLDC*, *PSAT1*, and *GNMT*) and energy metabolism (*CKMT1B*).
- NF-kB signaling pathway: *BTK* (Bruton's tyrosine kinase), *EDARADD* (Ectodysplasin A receptor), *ZAP70* (zeta-chain of T cell receptor associated protein kinase 70), *LTBR* (lymphotoxin-b receptor), and *CD14* (coreceptor for lipopolysaccharides). These five genes are coding for factors activating IKK degradation and subsequent NF-kB pathway activation.

Figure S9: Transcriptome characterization of KEPI_VAL cells. (a) Volcano plot representation of differentially expressed genes between all KEPI_VAL+S and all KEPI_VAL+S-S cell lines. (b) KEGG pathway enrichment in DEGs identified between KEPI_VAL+S-S and KEPI_VAL+S cells. (c)

Histogram representation of the normalized expression levels of selected genes in B19_KF, B19_VAL, KEPi_VAL+S, and KEPi_VAL+SS cells. (d) Box plot representation of average fold-changes calculated from DEGs between each pair of KEPi_VAL+S and KEPi_VAL+S-S cells (Mann-Whitney U test; ***, $p < 0.001$).

Table S1: Results of chimeric newborn analysis based on GFP-associated fluorescence and the presence of the GFP gene in the organs or tissues of the seven chimeric newborns.

	Newborn 1		Newborn 2		Newborn 3		Newborn 4		Newborn 5		Newborn 6		Newborn 7	
Age Of Death	1 day		2 days		1 day		1 day		1 day		1 day		5 days	
Cause Of Death	Natural		Sacrificed		Natural		Sacrificed		Sacrificed		Sacrificed		Sacrificed	
Sex [§]	Male		Female		Male		Male		Male		Female		Male	
Organs/Tissues	Fluo*	PCR [£]	Fluo*	PCR [£]	Fluo*	PCR [£]	Fluo*	PCR [£]	Fluo*	PCR [£]	Fluo*	PCR [£]	Fluo*	PCR [£]
Brain	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Ears	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
Lungs	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Heart	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Trachea	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Intestine	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
Stomach	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Kidneys	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
Spleen	+	+	N.D.		-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Liver	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Anterior Muscle	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Posterior Muscle	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Pancreas	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
Gonads	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Bladder	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Tongue	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
Skull Skin	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Tail	N.D.		N.D.		-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Eyes	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-

* Fluorescence detection: + = GFP positive; - = GFP negative.

£ PCR detection of GFP gene: + = presence; - = absence;

§ Determined after examination of testes vs ovaries

N.D. = Not Determined

Table S2: Origin and amplification of cDNAs included in the cDNA library.

cDNA	Origin	Primers
<i>eGFP</i>	pW10-eGFP (Negre et al., 2000)	-
<i>mKO2</i>	pFucci-G ₁ Orange (MBL Life Science, AM-V9003M)	F: 5'- GCTACCGGTCGCCACCATGTTGAGTGTG-3' R: 5'-ATTGAACTCGAGCTAGTAATGAGCTACTGCATCTTCTACC-3'
<i>tagBFP</i>	pCAG-mtagBFP (addgene #89685)	F: 5'- ATGAGCGAGCTGATTAAGG-3' R: 5'- CTTAATTAAGCTTG -3'
<i>Kate2</i>	pMA-RQ-FGF5- KAT-FAB (Lifetechnology)	F: 5'- GCTACCGGTCGCCACCATGTTGGAGAGGACTCTG-3' R: 5'- ATTGAACTCGAGTCAGGAATGTCCCAACTTG-3'
<i>BMI1</i>	pT3-EF1a-Bmi1 (Addgene #31783)	F: 5'-AACACAGGTGTCGTGACGCGATGCATCGAACAACGAGAATC-3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATCAACCAGAAGAAGTTGC -3'
<i>CCNE1</i>	pHCAGhycyE1 (Coronado et al., 2013)	F: 5'-GCTACCGGTCGCCACCATGCGGAGGGAGCGCAGGGGAGCGGGATG CGAAGGAGCGG -3' R: 5'- ATTGAACTCGAGTCACGCCATTTCCGGCC -3'
<i>DAX1</i>	pAd/CMV/DAX1- IRES-nEGFP (Addgene#29752)	F: 5'- GCTACCGGTCGCCACCATGCGGGCGAGAACCACCAGTG-3' R: 5'-ATTGAACTCGAGTTATATCTTTGTACAGAGCATTTCAGCATC-3'
<i>DPPA2</i>	RT-PCR from human PSCs	F: 5'- GCTACCGGTCGCCACCATGTCAGATGCAAATTTGGATAG-3' R: 5'- ATTGAACTCGAGCTACTTCTACTGTCATTAATC-3'
<i>DPPA4</i>	RT-PCR from human PSCs	F: 5'- GCTACCGGTCGCCACCATGTTGCGAGGCTCCGC-3' R: 5'- ATTGAACTCGAGCTATTCCCATTGGAGGCTTTTTATTAAGACC-3'
<i>DPPA5</i>	RT-PCR from human PSCs	F: 5'- GCTACCGGTCGCCACCATGGGAACTCTCCCGCA-3' R: 5'- ATTGAACTCGACTCACTTCATCCAAGGGCCTAG-3'
<i>E1A-12S</i>	pLPC 12S E1A (Addgene #18740)	F: 5'-AACACAGGTGTCGTGACGCGATGAGACATATTATCTGCCACGG-3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATTATGGCCTGGGGCCTTTAC-3'
<i>ERAS</i>	FUW-TetO-lox- ERAS (Addgene #52417)	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGGAGCTGCCAACAAAGC -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATCAGGCCACAGAGCAGCC-3'
<i>ESRRB</i>	pPB-PGK-hESRRB (Addgene #60434)	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGTCCTCGGACGACAGG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGAATTACATGGTGAGCCAGAGATG-3'
<i>ESRRG</i>	RT-PCR from human PSCs	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGGATTTCGGTAGAACTTTGC -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATCAGACCTTGGCCTCCAAC -3'
<i>GASC1</i>	RT-PCR from human PSCs	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGGAGGTGGCCGAGGTG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGACTAGATTCCAGCCTTCCCAATTTT AAC -3'
<i>GBX2</i>	RT-PCR from human PSCs	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGAGCGCAGCGTTCCCG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATCAGGGCCGGCCTGTTC -3'
<i>GFI1</i>	pENTR-GFI1 (Addgene #16168)	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGCCGCGCTCATTCTCGTCAA AG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATCATTTGAGCCATGCTGCGTC -3'
<i>KAT2B</i>	KAT2B (Addgene #39002)	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGCACCATCATCATC -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATTCGGATCCGTATCCACC-3'

KDM4D	RT-PCR from human PSCs	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGGAAACTATGAAGTCTAAGGCC AACTG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATTAGGGCACAGGGGCCA -3'
KHDC1	RT-PCR from human PSCs	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGCTGTGGCCTTCCAG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATTACGGATACAGTGAACCTAAATGG -3'
KLF2	pGG137mN1KLF2-2A-KLF4 (Tapponnier et al., 2017)	F: 5'- GCTACCGGTCGCCACCATGGCGCTGAGTG-3' R: 5'- ATTGAACTCGAGCTACATGTGCCGTTTCATGTGCAG-3'
KLF4	PMXs-hKLF4 (Takahashi et al., 2007)	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGGCTGTCAGTGACGCG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGACTACATGTGCCGTTTCATGTGC.-3'
KLF5	pcDNA3-KLF5 (Addgene #40900)	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGGAGAAGTATCTGACACC -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATCAGTTCTGGTGCCTCTTC-3'
KLF12	FLG-KLF12/pcDNA3.1-Neo (Addgene #81069)	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGAATATCCATATGAAGAGAAAA CAATAAAG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATCACACCAACATATGCCTC -3'
KLF17	cDNA synthesis	Cloning between Afel and XhoI sites in pW10
Large T	pSG5 Large T (Addgene #9053)	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATTATGTTTCAGGTTTCAGG -3'
MYC	PMXs-hc-MYC (Takahashi et al., 2007)	F: 5'-AACACAGGTGTCGTGACGCGATGCCCTCAACGTTAGC -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATCACGCACAAGAGTTCCG -3'
NR5A2	RT-PCR from human PSCs	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGTCTTCTAATTCAGATACTG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATTATGCTCTTTTGGCATG -3'
OOEP	cDNA synthesis	Cloning between Afel and XhoI sites in pW10
PRMT6	GST-PRMT6 (Addgene #34700)	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGTCGAGCCCAAGAAAAG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATCAGTCCTCCATGGCAAAG-3'
SALL4	RT-PCR from human PSCs	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGTCGAGGCCAAGCAG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATTAGCTGACCGCAATCTTGTTC-3'
SMAD7	pCMV5-SMAD7HA (Addgene #11733)	F: 5'- GCTACCGGTCGCCACCATGTTTCAGGACCAAACG-3' R: 5'- ATTGAACTCGAGCTACCGGCTGTTGAAGATGAC-3'
SOX2	PMXs-hSOX2 (Takahashi et al., 2007)	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGTACAACATGATGGAGACG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATCACATGTGTGAGAGGGG -3'
SUV39H1	RT-PCR from human PSCs	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGGTGGGGATGAGTCGC -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGACTAGAAGAGGTATTTGCGGC -3'
TBX3	cDNA synthesis	Cloning between Afel and XhoI sites in pW10
TFAP2C	tetON-TFAP2C-2ARFP	F 5'-GCTACCGGTCGCCACCATGTTGTGAAAAATAACCGATAATG-3' R 5'- ATTGAACTCGAGTTATTTCTGTGTTTCTCCATTTTCTC-3'
TFCP2L1	RT-PCR from human PSCs	F: 5'- AACACAGGTGTCGTGACGCGATGCTCTTCTGGCACACG -3' R: 5'- GCTAGCTACTAGCTAGTCGATCAGAGTCCACATTTTCAGG -3'

TRIM8	RT-PCR from human PSCs	F: 5'- GCTACCGGTCGCCACCATGGCGGAGAATTGGAAG-3' R: 5'- ATTGAAAGTCGACTTAGCTCGTCACGTAGTGTG-3'
USP21	Flag-HA-USP21 (Addgene #22574)	F: 5'- GCTACCGGTCGCCACCATGCCCCAGGCCTCTGAG-3' R: 5'- ATTGAACTCGAGTCACAGGCACCGGGGTG-3'

Coronado, D., Godet, M., Bourillot, P.Y., Tapponnier, Y., Bernat, A., Petit, M., Afanassieff, M., Markossian, S., Malashicheva, A., Iacone, R., *et al.* (2013). A short G1 phase is an intrinsic determinant of naive embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Res* 10, 118-131.

Tapponnier, Y., Afanassieff, M., Aksoy, I., Aubry, M., Moulin, A., Medjani, L., Bouchereau, W., Mayere, C., Osteil, P., Nurse-Francis, J., *et al.* (2017). Reprogramming of rabbit induced pluripotent stem cells toward epiblast and chimeric competency using Kruppel-like factors. *Stem Cell Res* 24, 106-117.

Negre, D., Mangeot, P.E., Duisit, G., Blanchard, S., Vidalain, P.O., Leissner, P., Winter, A.J., RoubourdinCombe, C., Mehtali, M., Moullier, P., *et al.* (2000). Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther* 7, 1613-1623.

Table S3: List of primers used for genomic PCR amplification of proviral DNAs and size of amplified DNA fragments

cDNA	Size (nt)	Primers
BMI1	542	Forward 5'-CCAAGTTCACAAGACCAGAC-3' Reverse 5'-GGTGACTGATCTTCATCTT-3'
CCNE1	748	Forward 5'-CCTCGGATTATTGCACCATC-3' Reverse 5'-TCCCCGCTCCCTTATAACC-3'
DAX1	856	Forward 5'-GGGTAAAGAGGCGCTACCA-3' Reverse 5'-ACAGAGCATTTCCAGCATCA-3'
DPPA2	737	Forward 5'-GAATTTCTTGAGGGGGAAG-3' Reverse 5'-TCCTCTGTGAGTGGTAGGC-3'
DPPA4	709	Forward 5'-GGACCTCCACAGAGAAGTCG-3' Reverse 5'-AAACTGCAGGTGAACCCAAC-3'
DPPA5	311	Forward 5'-TGAAAGTTCCCGAAGACCTG-3' Reverse 5'-TCACTTCATCCAAGGGCCTA-3'
E1A-12S	515	Forward 5'-CCACCTCCTAGCCATTTTGA-3' Reverse 5'-ACTGGTTTAAATGGGGCACAG-3'
ERAS	781	Forward 5'-AACCGGTGCCTAGAGAAGGT-3' Reverse 5'-CTCCTGGACCCTCTGGATCT-3'
ESRRB	927	Forward 5'-GAGAGCAGCCATACCTGAG-3' Reverse 5'-GTGAGCCAGAGATGCTTTCC-3'

ESRRG	844	Forward 5'-AGATCCCCAGACCAAGTGTG-3' Reverse 5'-AAGCTTCTGAACGGCTTCAA-3'
GASC1	969	Forward 5'-CATGTGGAAGACCACGTTTG-3' Reverse 5'-TCGGATGGGTCTGATTTCTC-3'
GBX2	731	Forward 5'-GCTCACCTCTACGCTCATGG-3' Reverse 5'-GCTGCTGATGCTGACTTCTG-3'
GFI1	975	Forward 5'-CGGAGTTTGAGGACTTCTGG-3' Reverse 5'-CCTTCCTCTGGAAACCCTTC-3'
KAT2B	387	Forward 5'-CCAATCCATGGGAAAAGAGA-3' Reverse 5'-CGGATCCGTATCCACCTTTA-3'
KDM4D	1221	Forward 5'-GTGCCAGAATCCAAATTGT-3' Reverse 5'-TGCGTAGCAGTGCCACTAAC-3'
KHDC1	900	Forward 5'-AACCGGTGCCTAGAGAAGGT-3' Reverse 5'-AGGAACGCTAAGTCACACGG-3'
KLF2	699	Forward 5'-TGC GTTCTATTACCCGAAC-3' Reverse 5'-CAGTGGTAGGGCTTCTACC-3'
KLF4	1145	Forward 5'-AACCGGTGCCTAGAGAAGGT-3' Reverse 5'-GTGCCTTGAGATGGGAACTC-3'
KLF5	924	Forward 5'-AACCGGTGCCTAGAGAAGGT-3' Reverse 5'-AGTAACTGGCAGGGTGGTG-3'
KLF12	728	Forward 5'-TCAGCGTCATCTTCGTCAAC-3' Reverse 5'-AATGGCTTCACTCCCGTATG-3'
KLF17	743	Forward 5'-TCTGGAGTGCACACCTCTTG-3' Reverse 5'-TGGGAGCGTTTGGTATAAGC-3'
Large T	1147	Forward 5'-CTGACTTTGGAGGCTTCTGG-3' Reverse 5'-GCTCAAAGTTCAGCCTGTCC-3'
MYC	1236	Forward 5'-AACCGGTGCCTAGAGAAGGT-3' Reverse 5'-TTGTGTTCGCTCTTGAC-3'
NANOG	673	Forward 5'-GATTGTGGGCCTGAAGAAA-3' Reverse 5'-GAATTTGGCTGGAACGCAT-3'
NR5A2	874	Forward 5'-AGCTATGCCCTCTGACCTGA-3' Reverse 5'-CTGCTGCGGGTAGTTACACA-3'
OOEP	412	Forward 5'-ATGGTCGATGATGCTGGTG-3' Reverse 5'-CATGGCCTTCAAGTTCTTC-3'
PRMT6	873	Forward 5'-AACCGGTGCCTAGAGAAGGT-3' Reverse 5'-AATCCCTGCACAACGATCTC-3'
SALL4	1229	Forward 5'-GAAACCCAGCACATCAACT-3' Reverse 5'-TGCTTAACAAAGGGGTCATCC-3'
SMAD7	270	Forward 5'-AACCGGTGCCTAGAGAAGGT-3' Reverse 5'-CTCCTCCTCCACCTCCCC-3'
SOX2	883	Forward 5'-AACCGGTGCCTAGAGAAGGT-3' Reverse 5'-GACTTGACCACCGAACCCAT-3'
SUV39H1	927	Forward 5'-GCGTATCCTCAAGCAGTTC-3' Reverse 5'-CAATACGGACCCGCTTCTTA-3'

<i>TBX3</i>	790	Forward 5'-GTCATTCTGGGACAAGCAT-3' Reverse 5'-GAATTCAGTTTCGGGGAACA-3'
<i>TFAP2C</i>	1156	Forward 5'-CACTGGAGTCGCCGAATATC-3' Reverse 5'-CTGGTCTCCAGGGTTCATGT-3'
<i>TFCP2L1</i>	791	Forward 5'-ACGAGAATGGGGAGTACACG-3' Reverse 5'-TGTGCTGAGGACAAAACAGG-3'
<i>TRIM8</i>	730	Forward 5'-AACCGGTGCCTAGAGAAGGT-3' Reverse 5'-CATGAGCATCTCCGGAT-3'
<i>USP21</i>	793	Forward 5'-AACCGGTGCCTAGAGAAGGT-3' Reverse 5'-GCCAGAAGGAGTGTGTGAT-3'

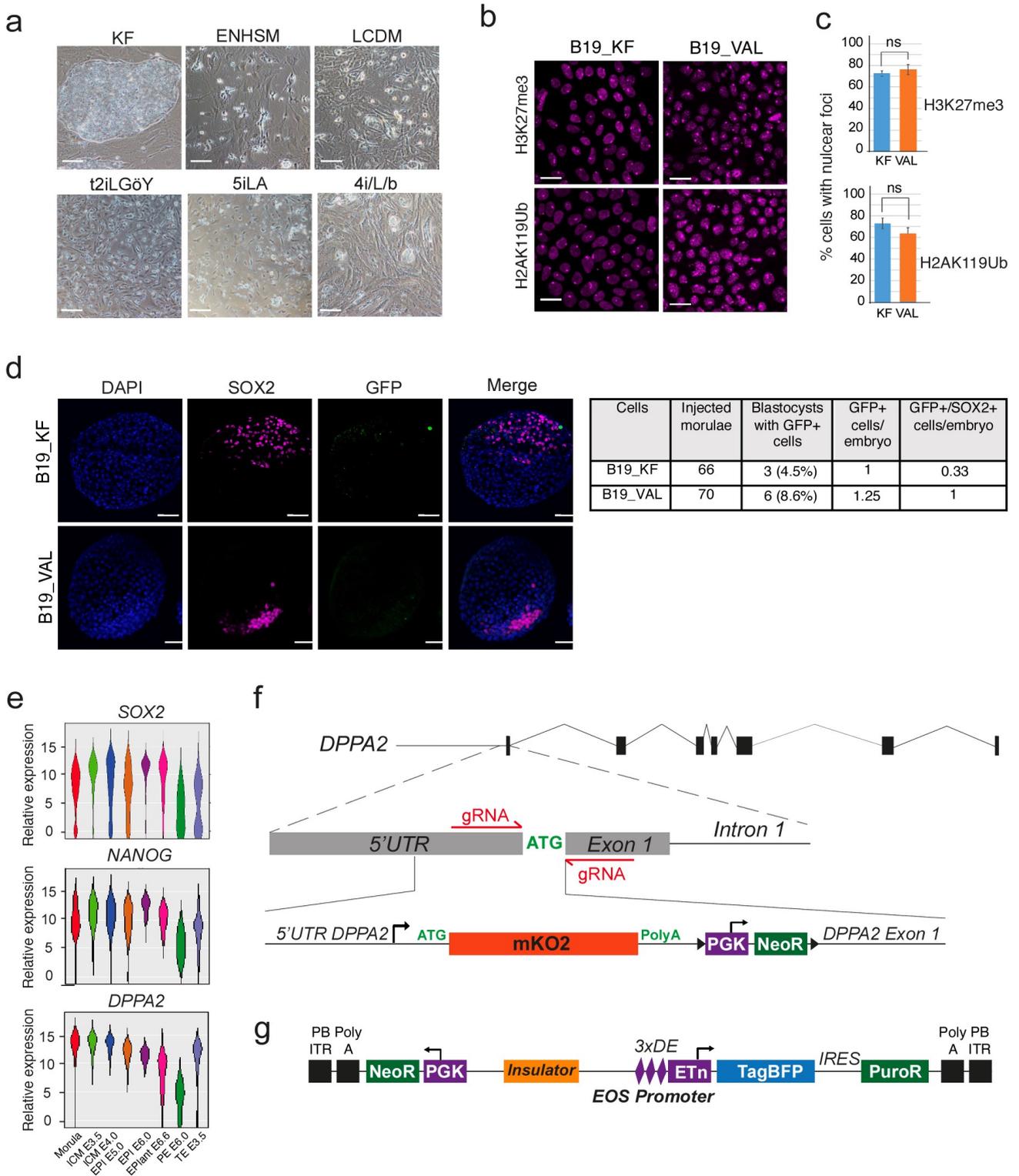


Figure S1

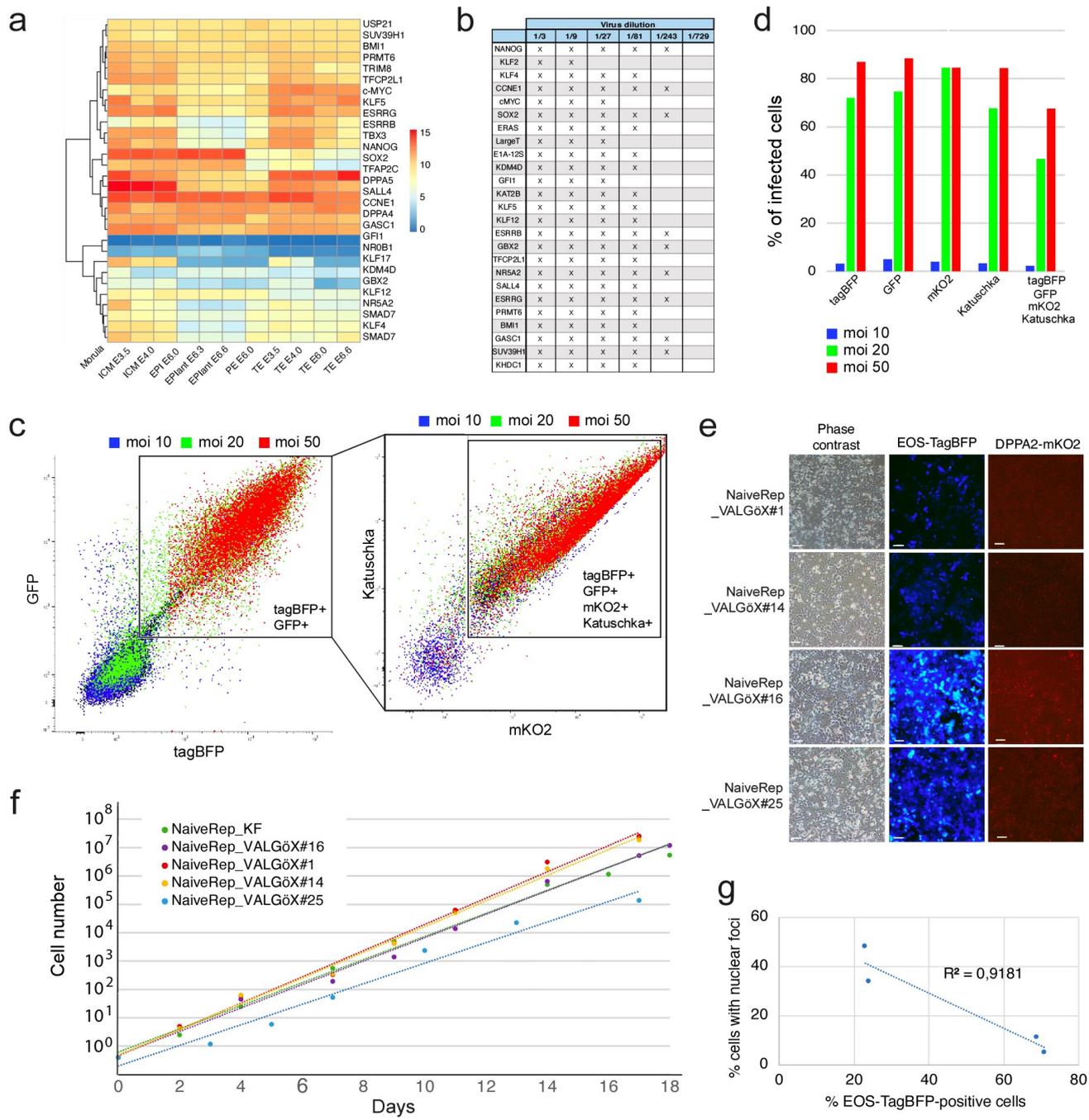


Figure S2

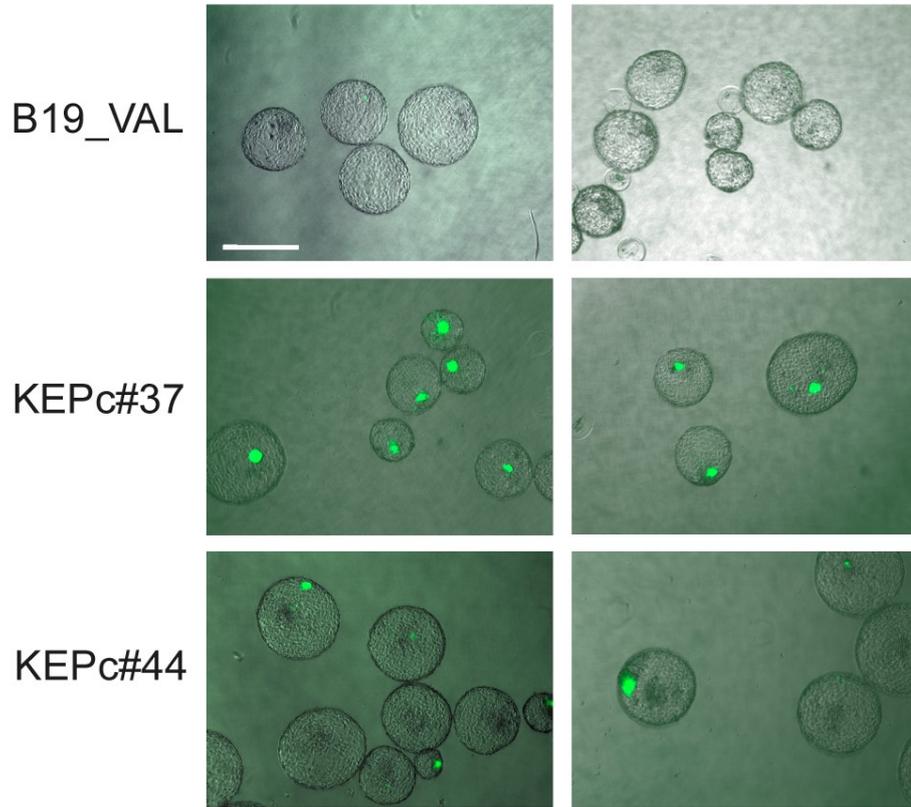


Figure S4

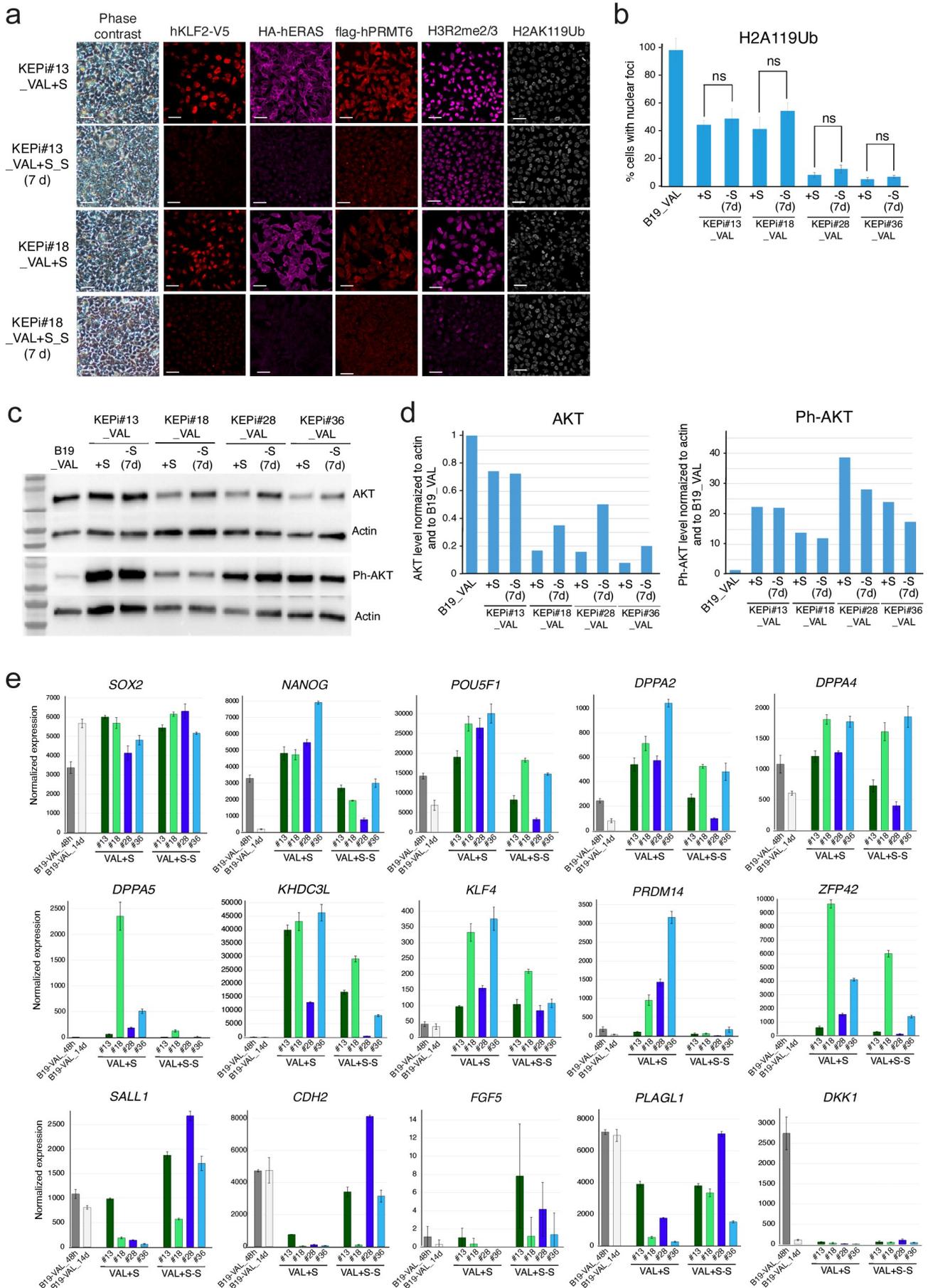


Figure S5

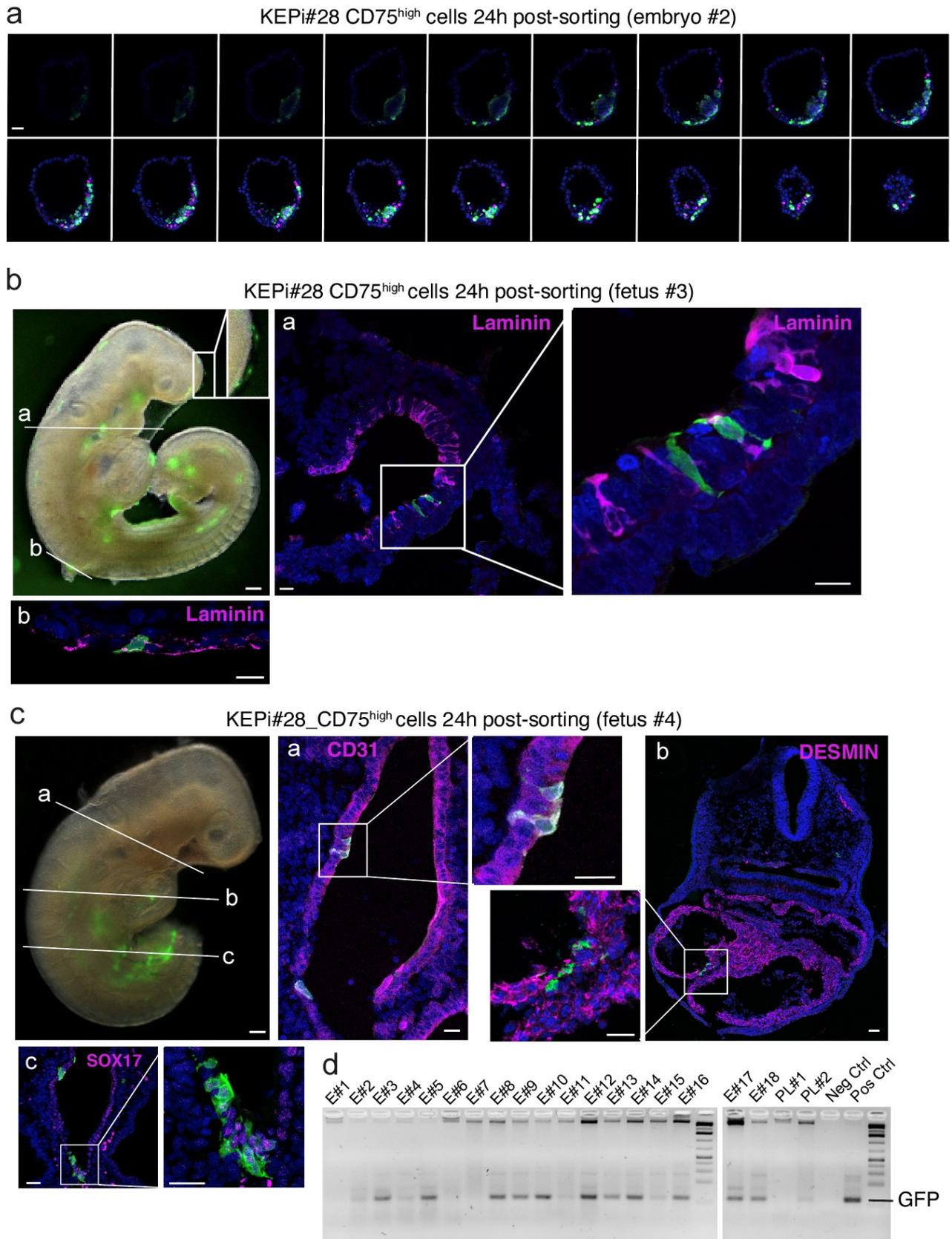


Figure S6

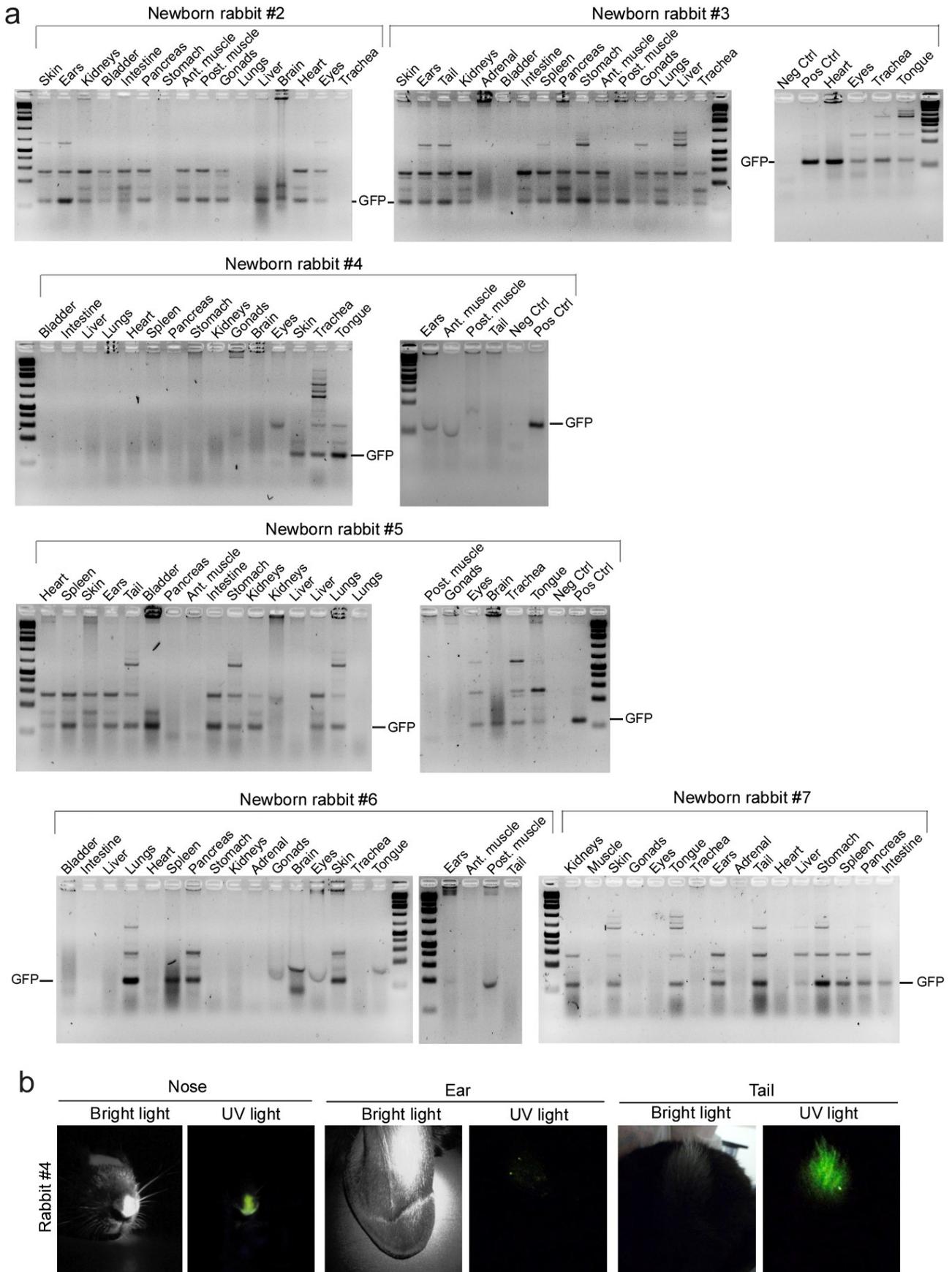


Figure S7

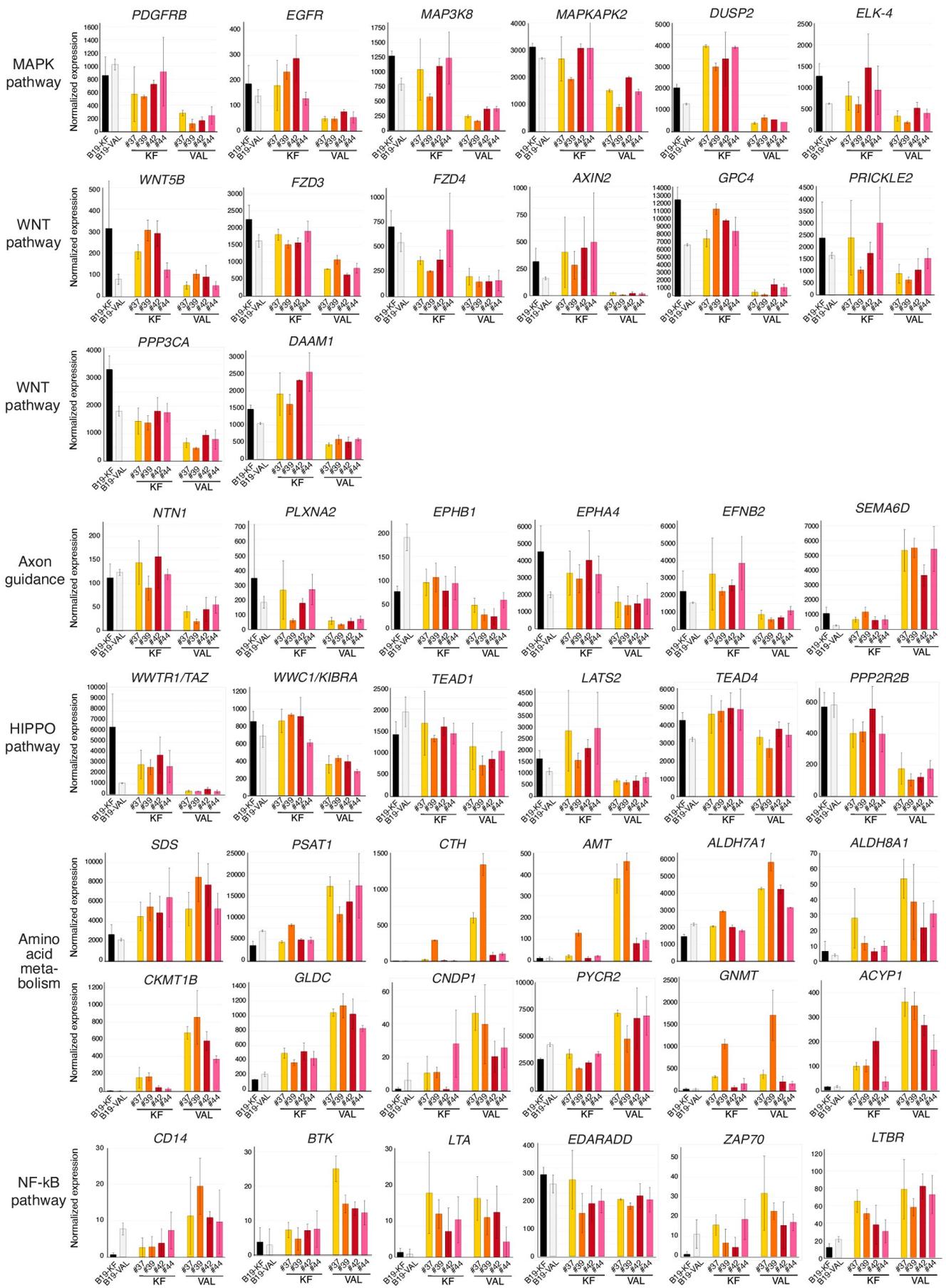
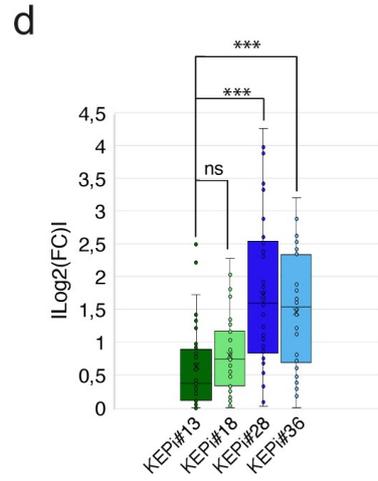
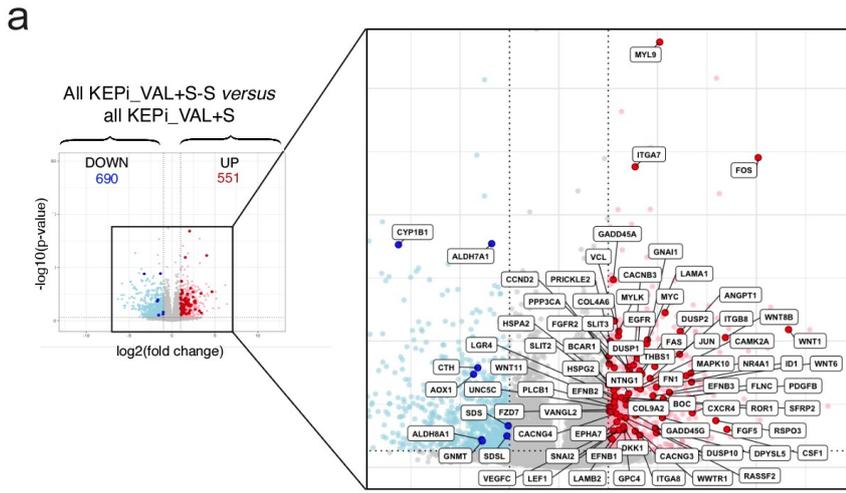


Figure S8



b KEGG pathway enrichment analysis

Downregulated genes in KEPI_VAL+S-S versus KEPI_VAL+S

Glycine, serine and threonine metabolism (p-value = 0.011)

SDS, CTH, SDSL, ALDH7A1, GNMT

Tryptophan metabolism (p-value = 0.055)

AOX1, CYP1B1, ALDH8A1, ALDH7A

Upregulated genes in KEPI_VAL+S-S versus KEPI_VAL+S

Wnt signaling pathway (p-value = 6.40E-09)

JUN, FZD7, CAMK2A, LEF1, PRICKLE2, WNT8B, DKK1, MAPK10, WNT6, PPP3CA, CCND2, SFRP2, VANGL2, WNT11, MYC, RSP03, ROR1, GPC4, WNT1, PLCB1, LGR4

Focal adhesion (p-value = 7.89 E-07)

JUN, LAMA1, LAMB2, PDGFB, FN1, EGFC, THBS1, EGFR, MYLK, MAPK10, CCND2, COL4A6, ITGA8, ITGB8, ITGA7, COL9A2, FLNC, MYL9, VCL, BCAR1

Upregulated genes in KEPI_VAL+S-S versus KEPI_VAL+S (follows)

MAPK signaling pathway (p-value = 2.34E-06)

JUN, DUSP2, CSF1, NGPT1, GADD45A, DUSP1, DGFB, VEGF, COS, HSPA2, EGFR, GADD45G, FGF5, MAPK10, PPP3CA, NR4A1, CACNB3, DUSP10, MYC, FAS, FLNC, CACNG3, FGFR2, CACNG4

ECM-receptor interaction (p-value = 1.53 E-04)

LAMA1, LAMB2, COL4A6, ITGA8, FN1, ITGB8, ITGA7, COL9A2, HSPG2, THBS1

Axon guidance (p-value = 1.63E-04)

NTNG1, EPHA7, CAMK2A, CXCR4, UNC5C, GNAI1, EFNB2, EFNB1, PPP3CA, EFNB3, DPYSL5, BOC, SLIT3, SLIT2, MYL9

Hippo signaling pathway (p-value = 0.002)

WNT6, WWTR1, CCND2, RASSF2, WNT11, MYC, FZD7, ID1, LEF1, SNAI2, WNT8B, WNT1

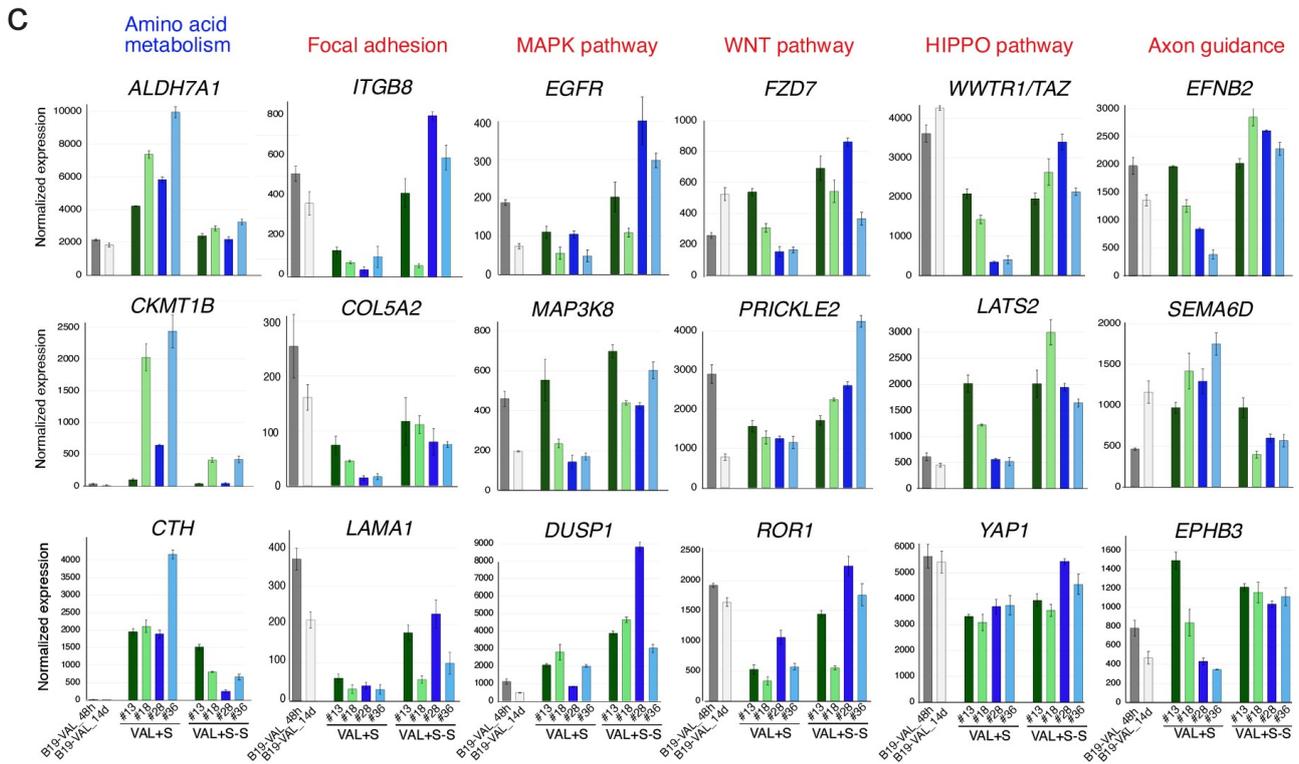


Figure S9