

# Avis de Soutenance

Madame Hong PHAM

## Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés  
*Reprogrammation génétique et épigénétique des cellules souches pluripotentes de lapin vers la pluripotence naïve*

Travaux dirigés par Madame Nathalie BEAUJEAN

Soutenance prévue le **vendredi 03 avril 2026** à 9h30

Lieu : Salle de conférences Stem cell and brain research institute, 18 Av. du Doyen Jean Lépine,  
69500 Bron

### Composition du jury proposé

Mme Nathalie BEAUJEAN	Directrice de recherche	INRAE Lyon	Directrice de thèse
Mme Claire CHAZAUD	Directrice de recherche	INSERM Clermont-Ferrand	Rapporteuse
M. Hervé ACLOQUE	Directeur de recherche	INRAE Paris	Rapporteur
Mme Armelle CORPET	Maître de conférences	Lyon 1 Université	Examinatrice
M. Michel COHEN-TANNOUDJI	Directeur de recherche	CNRS Paris	Examineur

**Mots-clés :** cellules souches pluripotentes, reprogrammation, chimérique, épigénétique, CRISPR d'activation/interférence

### Résumé :

Les cellules souches pluripotentes (PSC) existent sous plusieurs états développementaux qui diffèrent par les voies de signalisation qu'elles mobilisent, leurs dépendances aux facteurs de croissance, leurs paysages épigénétiques et leur potentiel développemental. Alors que l'état de pluripotence amorcée est associé à un potentiel développemental restreint, l'état de pluripotence naïve confère aux PSC la capacité de coloniser efficacement des embryons hôtes et de générer des chimères germinales. Bien que la pluripotence naïve ait été largement caractérisée chez les rongeurs, son établissement chez les espèces non rongeurs demeure difficile. Le lapin constitue un modèle particulièrement pertinent pour l'étude de la pluripotence en raison de sa proximité phylogénétique et développementale avec l'humain et de son utilisation en recherche biomédicale. Cependant, les cellules souches embryonnaires (ESC) et les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) de lapin ont jusqu'à présent été confinées à un état amorcé, limitant leur potentiel développemental. L'objectif de ce travail était d'induire et de stabiliser la pluripotence naïve dans les iPSC de lapin au moyen d'une combinaison de stratégies génétiques et épigénétiques. Trois approches complémentaires ont été développées : la surexpression de gènes associés à l'état naïf, l'activation ciblée de réseaux endogènes de pluripotence et le remodelage épigénétique des

modifications post-traductionnelles de l'histone H3 lysine 9 (H3K9). Dans un premier temps, des iPSC de lapin ont été modifiées pour surexprimer les régulateurs humains KLF2, ERAS et PRMT6, générant des cellules KEPI, cultivées dans un nouveau milieu de culture supportant la pluripotence naïve (milieu VALGÖX, contenant de la vitamine C, le LIF, l'activine A et des inhibiteurs des voies PKC et WNT). Au sein de ces cellules KEPI, une sous-population CD75high présentait des caractéristiques moléculaires et fonctionnelles de pluripotence naïve, permettant l'obtention d'embryons chimériques et une transmission germinale. Toutefois, l'instabilité de cette sous-population au cours de la culture à long terme a révélé une reprogrammation naïve incomplète, probablement liée à la dépendance aux transgènes exogènes. Afin de surmonter cette limitation, une plateforme d'activation et d'interférence CRISPR (CRISPRai) a été mise en place pour manipuler directement les réseaux endogènes de pluripotence. L'activation inductible des gènes endogènes KLF2, ERAS et PRMT6 a conduit à la génération d'iPSC CRISPRa-KEP présentant des caractéristiques naïves homogènes, une réorganisation étendue de la chromatine, une colonisation embryonnaire efficace sans tri cellulaire ainsi qu'une contribution au développement de fœtus chimériques. Enfin, l'étude des modifications post-traductionnelles de H3K9 a montré que l'inhibition des histones désacétylases de classe I et des méthyltransférases G9a/GLP augmente l'acétylation de H3K9, réduit la méthylation répressive et favorise l'acquisition d'états transcriptionnels et chromatinien de type masse cellulaire interne. De plus, le remodelage de la chromatine ciblant H3K9 améliorerait la dérivation des ESC ainsi que la réinitialisation naïve des iPSC de lapin, y compris par des approches de reprogrammation sans transgène basées sur les ARNm. Dans l'ensemble, cette étude démontre que la pluripotence naïve chez le lapin peut être obtenue et stabilisée par des interventions génétiques et épigénétiques coordonnées. Ces résultats constituent une base pour la génération de cellules souches pluripotentes naïves de lapin compétentes sur le plan développemental, faisant du lapin un modèle non rongeur de choix pour l'étude comparative de la pluripotence, du développement précoce des mammifères et des modèles embryonnaires avancés basés sur les cellules souches.

### Summary:

Pluripotent stem cells (PSCs) exist in multiple developmental states that differ in their signaling requirements, growth factor dependencies, epigenetic landscapes, and developmental potential. While the primed state of pluripotency is associated with restricted developmental potential, the naïve state of pluripotency confers on PSCs the ability to efficiently colonize host embryos and generate germline chimeras. Although naïve pluripotency has been extensively characterized in rodents, its establishment in non-rodent species remains challenging. The rabbit represents a particularly relevant model for pluripotency studies due to its close phylogenetic and developmental similarities to humans as well as its extensive use in biomedical and transgenic applications. However, both rabbit embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) have so far been confined to a primed pluripotent state, limiting their developmental potential and translational applications. The aim of this work was to induce and stabilize naïve pluripotency in rabbit iPSCs through an integrated combination of genetic and epigenetic strategies. Three complementary approaches were developed: overexpression of naïve-associated genes, targeted activation of endogenous pluripotency networks, and epigenetic remodeling of histone H3 lysine 9 (H3K9) post-translational modifications. In the first part of the study, rabbit iPSCs were engineered to overexpress the human pluripotency regulators KLF2, ERAS, and PRMT6, generating KEPI cells which were cultured under a newly defined naïve culture condition (VALGÖX medium, containing Vitamin C, LIF, activin A, PKC and WNT inhibitors). Within these KEPI cells, a CD75high subpopulation exhibited molecular and functional hallmarks of naïve pluripotency, including extensive contribution to chimeric embryos and confirmed germline transmission. However, the instability and rarity of this subpopulation during long-term culture revealed heterogeneity and incomplete naïve reprogramming, likely due to reliance on exogenous transgenes. To overcome this

limitation, a CRISPR activation and interference (CRISPRai) platform was established to directly manipulate endogenous pluripotency networks. Using an inducible dCas9-effector-based system combined with activating guide RNAs, endogenous rabbit KLF2, ERAS, and PRMT6 were activated, leading to the generation of CRISPRa-KEP iPSCs. These cells exhibited homogeneous naïve-like characteristics, extensive chromatin reorganization, efficient embryo colonization without the need for cell sorting, and contribution to chimeric fetuses. These results indicate that activation of endogenous regulatory circuits markedly improves the stability and developmental competence of naïve-like rabbit iPSCs. In parallel with these genetic approaches, the role of H3K9 post-translational modifications in pluripotency regulation was investigated. Pharmacological inhibition of class I histone deacetylases and G9a/GLP methyltransferases increased H3K9 acetylation, reduced repressive H3K9 methylation, promoted inner cell mass-like transcriptional and chromatin states, and suggested an enhancement of rabbit ESC derivation efficiency. Importantly, H3K9-targeted chromatin remodeling seemed to facilitate naïve resetting of rabbit iPSCs and improved mRNA-based, transgene-free reprogramming approaches. Overall, this study demonstrates that naïve pluripotency in the rabbit can be achieved and stabilized through coordinated genetic and epigenetic interventions. The integrated framework described here enables the generation of developmentally competent naïve rabbit pluripotent stem cells and establishes the rabbit as a valuable non-rodent model for comparative pluripotency, early mammalian development, and advanced stem-cell-based embryo modeling.