HAL open science

Dérivation de cellules souches embryonnaires pluripotentes chez le lapin

Murielle Godet, Suzy S. Markossian, Thierry Joly, Pierre Osteil, Pierre Savatier, Marielle Afanassieff

To cite this version:

Murielle Godet, Suzy S. Markossian, Thierry Joly, Pierre Osteil, Pierre Savatier, et al.. Dérivation de cellules souches embryonnaires pluripotentes chez le lapin. 3. Journées d'Animation Scientifique du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Elevage, Oct 2009, Tours, France. 2009, 3èmes Journées d'Animation Scientifique du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Elevage. hal-02751466

HAL Id: hal-02751466

https://hal.inrae.fr/hal-02751466

Submitted on 3 Jun 2020

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.

DERIVATION DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES PLURIPOTENTES CHEZ LE LAPIN.

Murielle GODET*, Suzy MARKOSSIAN, Thierry Joly, Pierre OSTEIL, Pierre SAVATIER, Marielle AFANASSIEFF

Inserm U846, USC INRA200 Lyon
murielle.godet@inserm.fr
Poster X

CT 2

INTRODUCTION

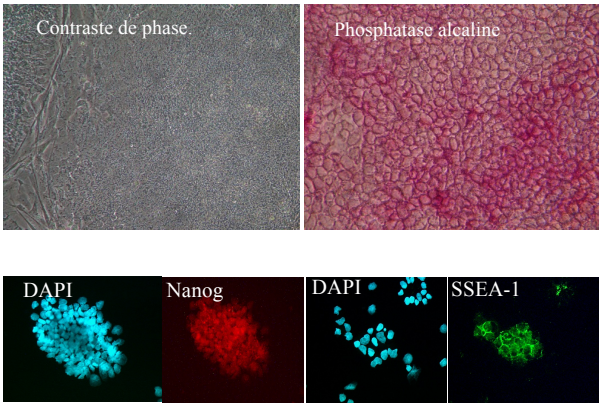
L'obtention de cellules souches embryonnaires pluripotentes (cellules ES) chez le lapin est un objectif important pour le développement biotechnologique de la transgenèse dans les domaines de l'élevage et de la médecine. Seules des cellules « ES like » qui expriment les marqueurs d'auto renouvellement Oct4, Nanog et SSEA-1 ont été récemment dérivées chez le lapin en cultivant des blastocystes entiers en présence de bFGF et de LIF avec un rendement de 10% (Honda *et coll*., 2008). Cependant, les cellules ES de lapin obtenues ne sont pas capables de former des chimères par colonisation du bouton embryonnaire d'un blastocyste. L'objectif de notre projet est d'obtenir des cellules souches pluripotentes de lapin modifiables génétiquement et qui sont capables de former des chimères somatiques et germinales.

MATERIEL ET METHODES

Trois jours après fécondation, les embryons de lapin New Zeland au stade morula ont été récoltés. Après 24h de culture (38°C, 5% CO2) les manteaux muqueux des embryons au stade blastocyste ont été éliminés par une digestion protéolytique (Pronase). Les boutons embryonnaires séparés du trophectoderme par immunochirurgie ont été mis en culture sur des tapis de fibroblastes de souris en milieu DMEM/F12 + 20% KO-SR en présence de bFGF (12 ng/ml) seul ou avec et sans LIF. Après 5 à 6 jours de culture (37°C et 5% C02), les colonies obtenues ont été traitées à la collagénase II (1mg/ml, 1min), disséquées mécaniquement puis cultivées sur de nouveaux tapis de cellules nourricières. Le repiquage des colonies est réalisé tous les 3 ou 4 jours. Les lignées de cellules ES de lapin sont considérées comme établies après 10 passages successifs. Les marqueurs de pluripotence ont été analysés par immunofluorescence indirecte sur des cellules ES fixées à la paraformadehyde 2% à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines Oct4, Nanog et SSEA-1. La capacité de cellules embryonnaires isolées à reformer des colonies de cellules a été testée après trypsination et remise en culture des cellules individualisées sur des tapis de cellules nourricières.

RESULTATS

Le pourcentage de lignées de cellules souches embryonnaires de lapin dérivées à partir de la mise en culture des boutons embryonnaires de blastocyste est supérieur à 50%. Douze lignées ont été sélectionnées sur leur aspect de cellules souches et amplifiées. Les cellules ES de lapin obtenues expriment fortement la phosphatase alcaline ainsi que les marqueurs de pluripotence Oct4, Nanog et SSEA-1. Les cellules ES ont été cultivées jusqu'au quinzième passage sans perte de leur morphologie, ni de leur capacité à s'auto renouveler. Les cellules ES isolées ont la capacité de reformer des colonies avec un rendement proche de 5%.



Caractérisation des cellules ES de lapin au passage 10.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Contrairement aux résultats présentés par Honda *et coll*., 2008, la mise en culture du bouton embryonnaire seul, malgré le traitement enzymatique, favorise la dérivation des cellules souches embryonnaires dépendante du bFGF. De plus, en conditions de culture similaires, le LIF n'apparaît pas comme nécessaire à la dérivation de cellules embryonnaires chez le lapin. L'expression de la phosphatase alcaline et des marqueurs Oct4, Nanog et SSEA-1 ainsi que la capacité des cellules obtenues à être clonées souligne le caractère pluripotent des cellules « ES like » obtenues. La caractérisation complète des lignées obtenues est en cours de réalisation.

REFERENCES

Arata Honda ; Atsuo Ogura 2008 : Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. RBM Online Vol 17, n°5 p706-715.