



**HAL**  
open science

## Obtention de cellules souches pluripotentes chez le lapin et la chèvre

Marielle Afanassieff

► **To cite this version:**

Marielle Afanassieff. Obtention de cellules souches pluripotentes chez le lapin et la chèvre. Journée Cellules Souches de l'INRA PHASE, Jul 2008, Paris, France. hal-02815537

**HAL Id: hal-02815537**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02815537>**

Submitted on 6 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.



I.N.R.A. - Département PHASE  
Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage

## PROGRAMMATION ET DÉPROGRAMMATION CELLULAIRE ET CELLULES SOUCHES

**Mercredi 9 Juillet 2008**

**Salle B 115 - INRA, 147 rue de l'université – Paris 7<sup>ème</sup>**

### PROGRAMME

- 9h30** *Accueil des participants*
- 10h00 - 10h30** "Towards dedifferentiation in model fish"  
*Jean Stéphane Joly - DEPSN Gif sur Yvettes*
- 10h30 - 11h00** "Quelle part est due aux défauts de reprogrammation dans les échecs du développement embryonnaire après transfert nucléaire chez le poisson rouge"  
*Catherine Labbé - SCRIBE Rennes*
- 11h00 - 11h30** "Propriétés des cellules souches dérivées des embryons clonés de souris"  
*Alice Jouneau - BDR Jouy en Josas*
- 11h30 - 12h00** "Place d'un gène d'origine rétrovirale, ENS-1, dans les propriétés des cellules souches embryonnaires de poulet"  
*Anne Mey - IGFL Lyon*
- 12h00 - 12h30** "Obtention de cellules souches pluripotentes chez le lapin et la chèvre"  
*Marielle Afanassieff - Primastem Lyon*
- 12h30 - 13h00** "Identification des gènes de pluripotence chez le poulet : Acteurs potentiels de la reprogrammation ?"  
*Bertrand Pain - CNRS Clermont Ferrand*
- 13h00-14h00** *Déjeuner*
- 14h00-14h30** "Participation de précurseurs dérivés du tissu adipeux à la myogenèse"  
*Francis Bacou - DCC Montpellier*
- 14h30 - 15h00** "Gène d'autorenouvellement et reprogrammation cellulaire chez les primates"  
*Pierre Savatier - INSERM Lyon*
- 15h00 - 15h15** *Pause*
- 15h15- 17h00** **Discussion générale.** Lettre d'intention pour UE sur le thème de "Reprogrammation Cellulaire", en axant sur les animaux modèles et autres espèces non humaines

# **Obtention de cellules souches pluripotentes chez le lapin et la chèvre**

**Marielle Afanassieff, Murielle Godet  
Suzy Markossian, Pierre Osteil et Sophie Voisin**

**PrimaStem  
Institut Cellule Souche et Cerveau  
Inserm U846, Bron**



# PrimaStem

Pierre Savatier et Colette Dehay

**Dérivation de  
cellules souches  
chez le lapin et la chèvre  
USC 2008**

Marielle Afanassieff, CR1 Inra

Suzy Markossian, AI Inra  
Murielle Godet, CR1 Inra  
Pierre Osteil, Etudiant Ephe  
Sophie Voisin, Etudiante Isara

Dérivation, culture  
et différenciation  
de cellules souches de  
primate  
humain et non humain

Florence Wianny, CR1 Inserm  
Agnieszka Bernat, Post-Doc  
Emeline Fontaine, AI Inserm  
Pierre Osteil, Etudiant Ephe

ISARA Lyon  
Thierry Joly  
Pascal Salvetti

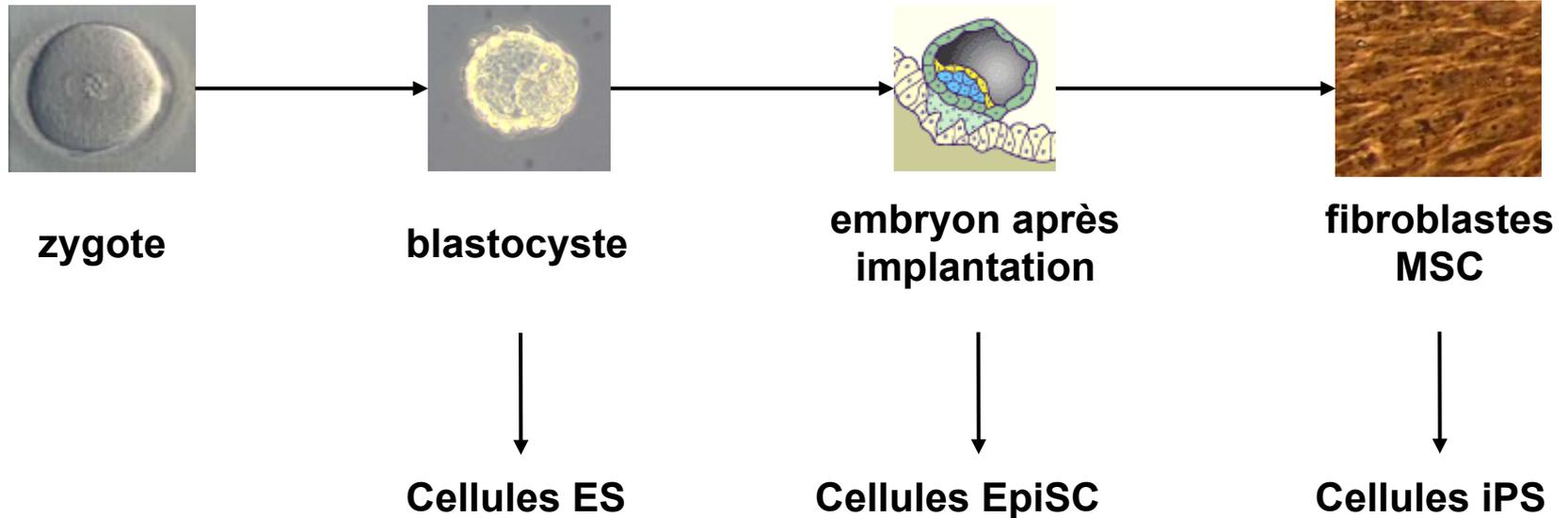
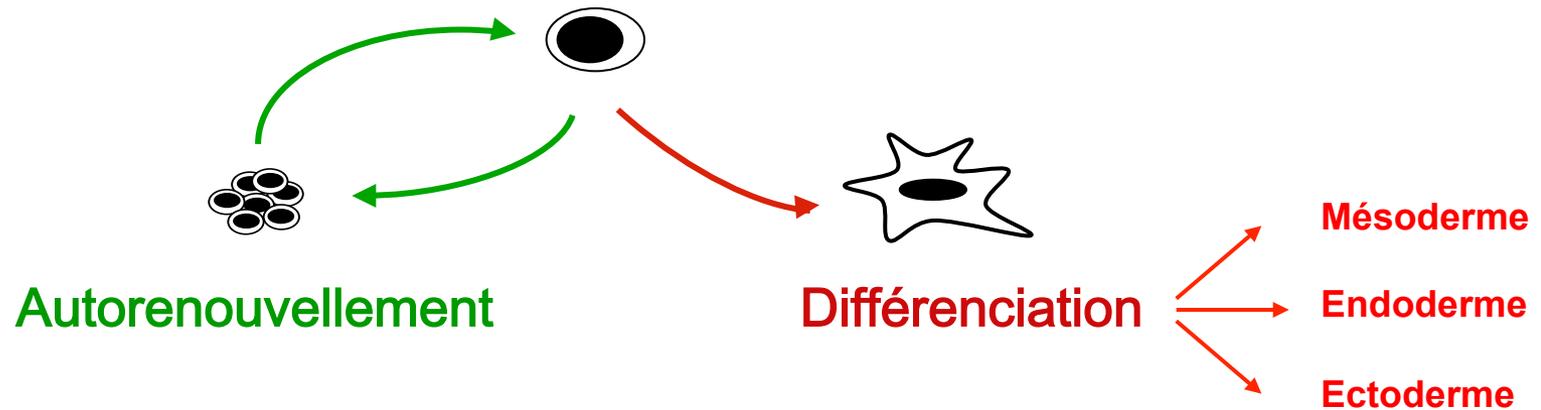
INRA Jouy  
Jean-Paul Renard  
Véronique Duranthon  
Alice Jouneau

INRA Nouzilly  
Pascal Mermillot  
Gérard Baril  
Nati Poulin

INSERM Lyon  
François Loïc Cosset  
Didier Nègre

Kunming  
Weizhi Ji  
Shufen Wang

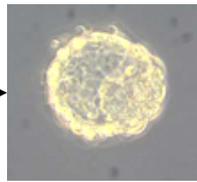
# Trois types de cellules souches pluripotentes chez la souris



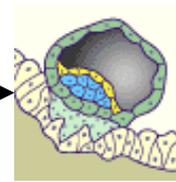
# Stratégies développées chez le lapin et la chèvre



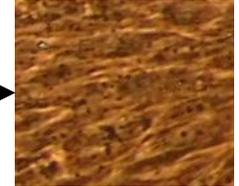
zygote



blastocyste



embryon après  
implantation



fibroblastes  
MSC



**1**

## Cellules ES

Utilisation des techniques  
et des conditions employées  
pour l'isolement de lignées  
de cellules ES de primates

**2**

## Cellules ES induites

Stimulation de  
l'autorenouveaulement des  
cellules blastocytaires  
par surexpression de  
Oct-4, Nanog et Sox2

**3**

## Cellules EpiSC

Dérivation de  
cellules EpiSC

**4**

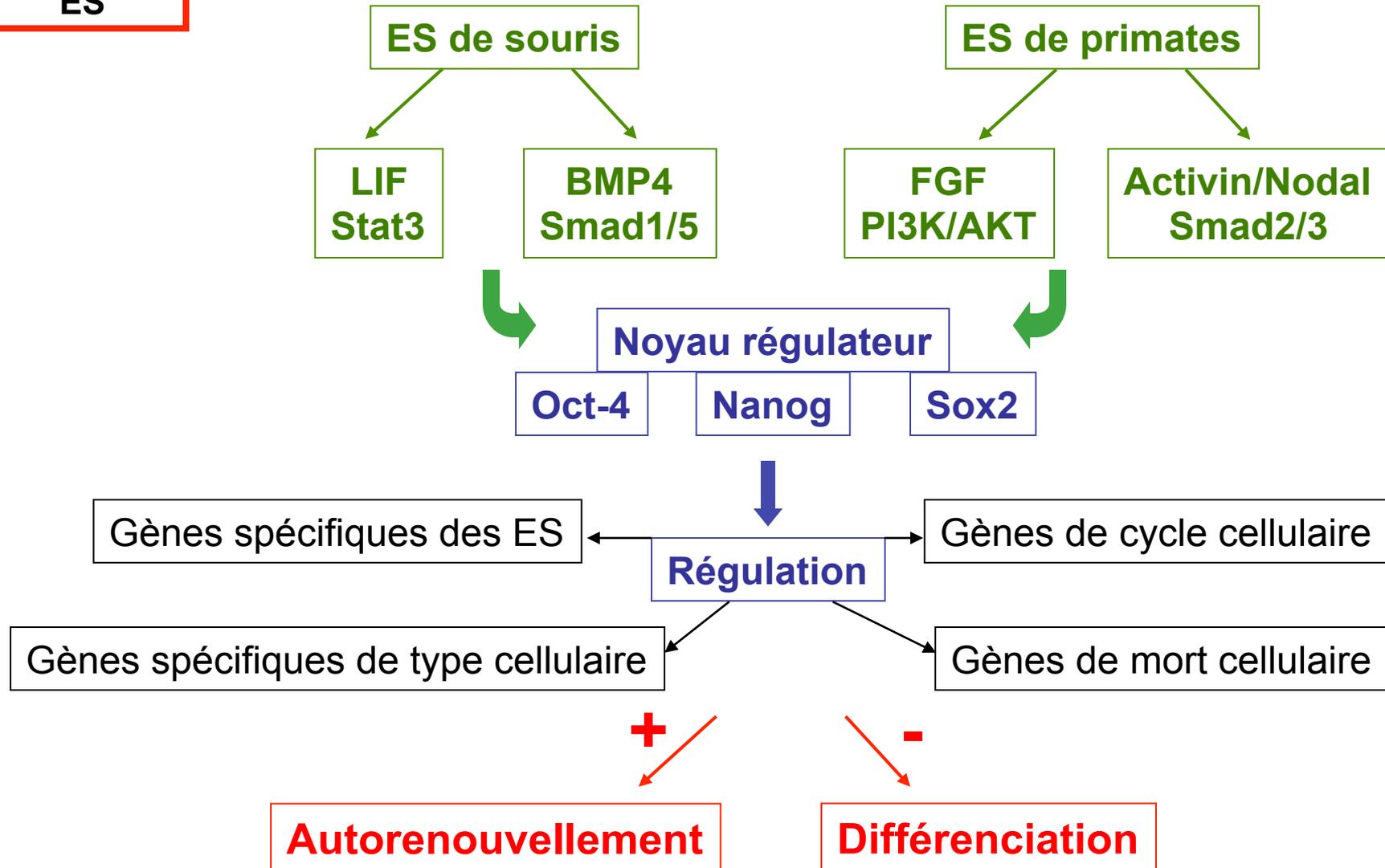
## Cellules iPS

Induction de cellules  
souches pluripotentes  
à partir de fibroblastes  
adultes

1

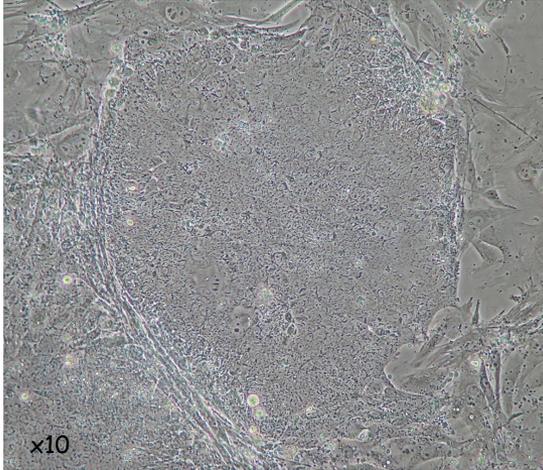


# Régulation de l'autorenouveaulement des cellules ES

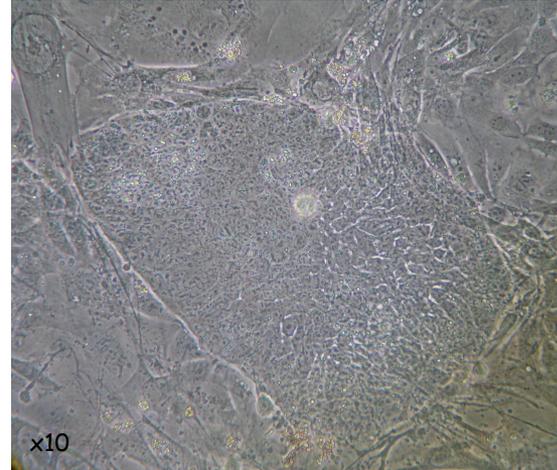


# Morphologie des colonies de type ES

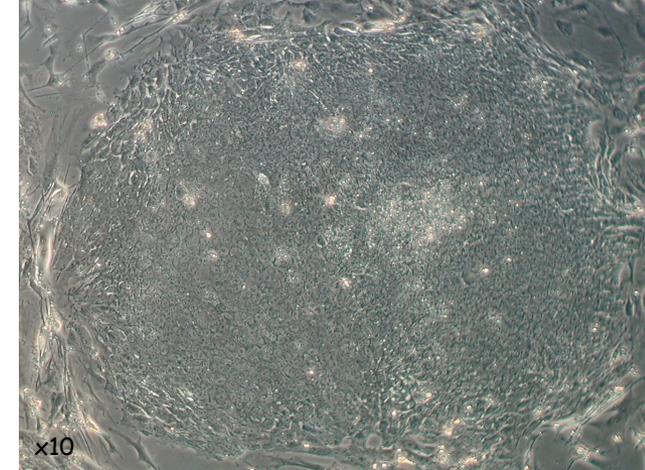
Colonie de cellules  
de lapin de type ES



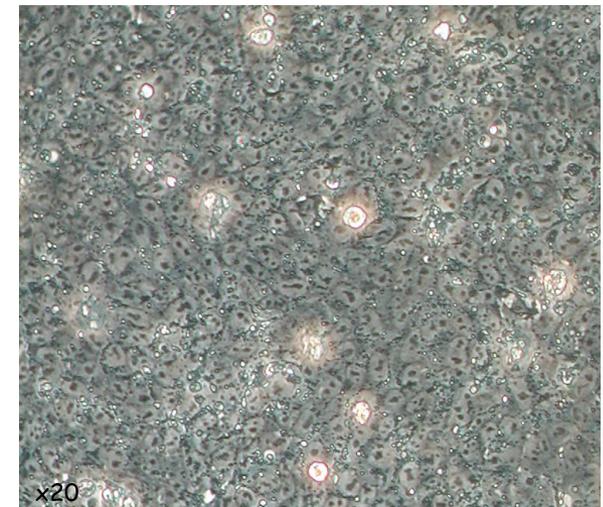
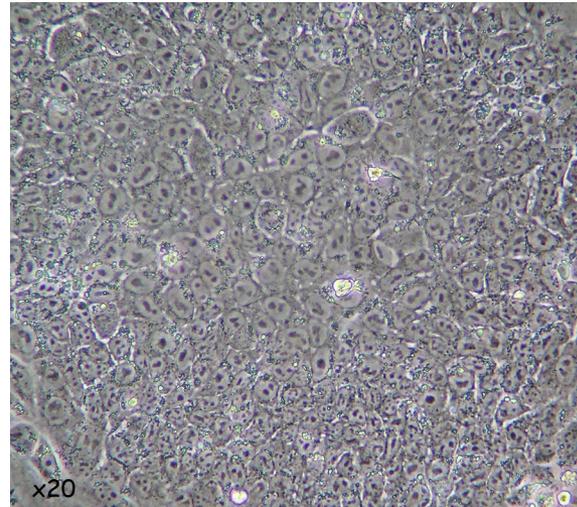
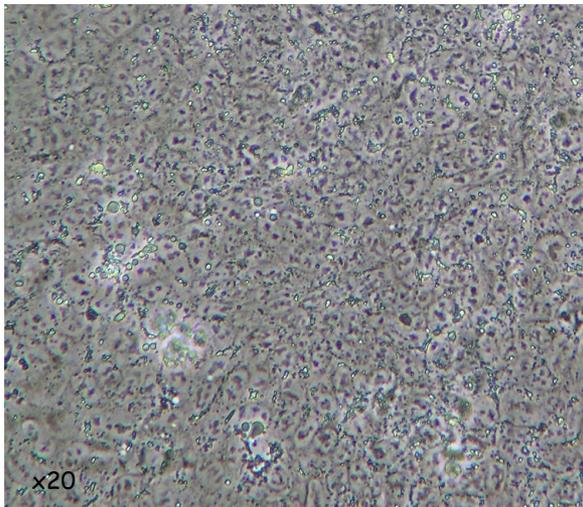
Colonie de cellules  
de chèvre de type ES



Colonie de cellules  
ES humaines



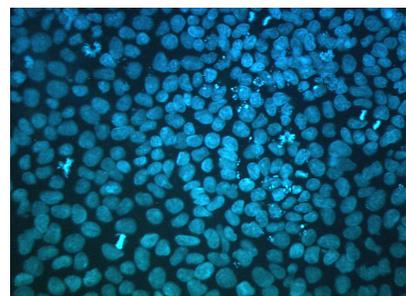
➤ Colonies compactes et plates



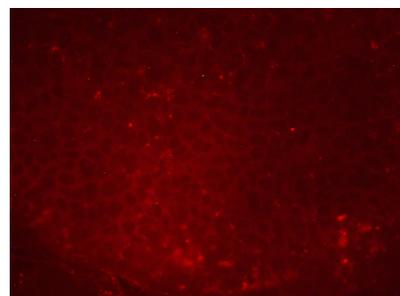
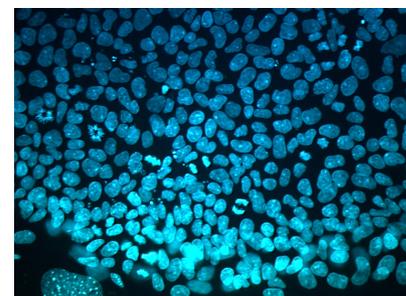
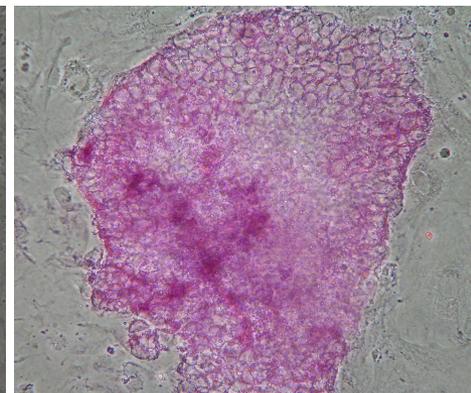
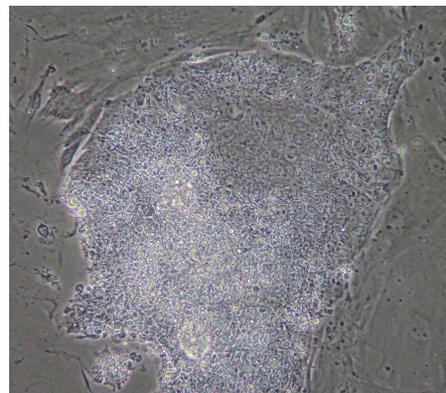
➤ Rapport nucléo-cytoplasmique important, nucléoles clairement visibles

# Caractérisation des cellules de lapin de type ES

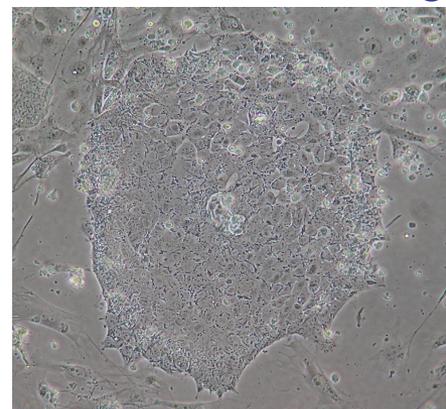
Test PA



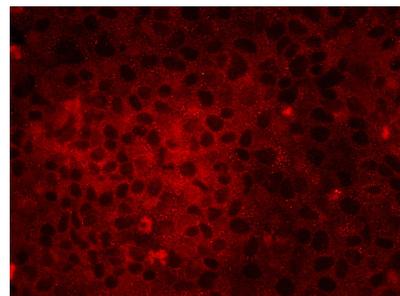
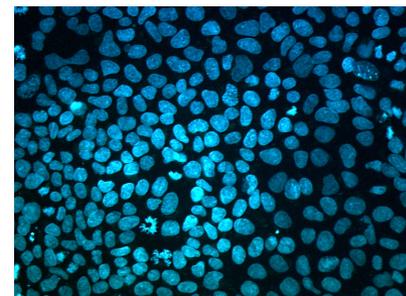
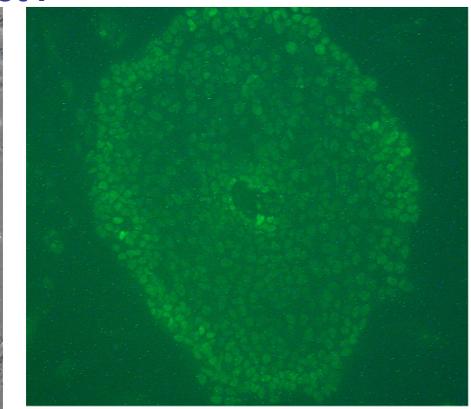
SSEA-1



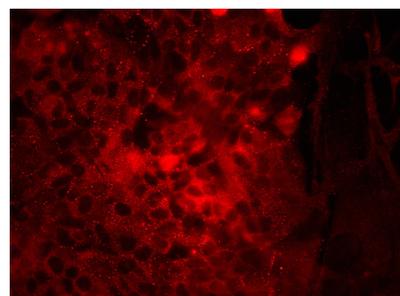
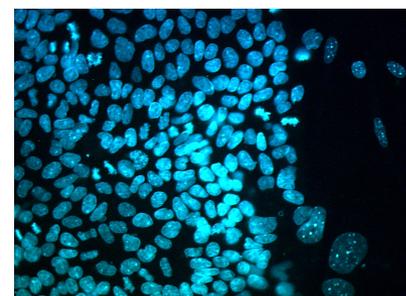
SSEA-4



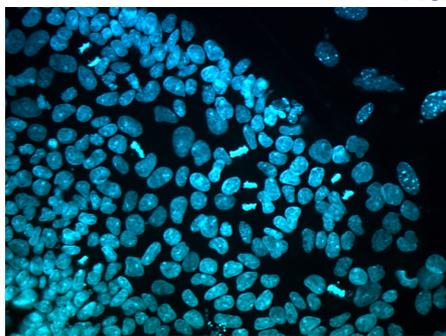
Oct4



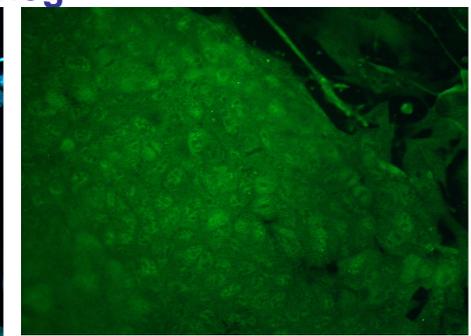
TRA-1-81



TRA-1-60



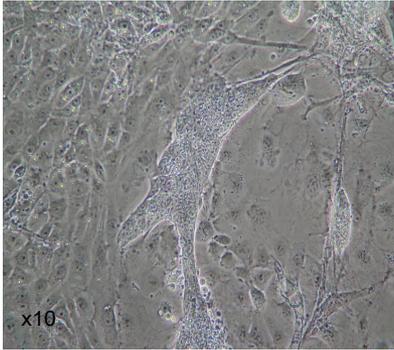
Nanog



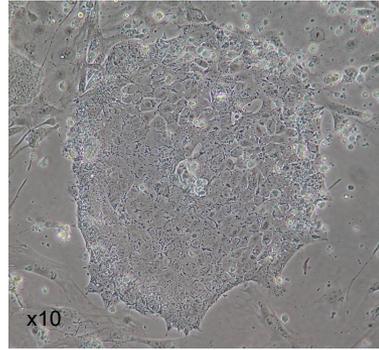
# Expression de Oct-4 dans les cellules de type ES

Contraste de Phase

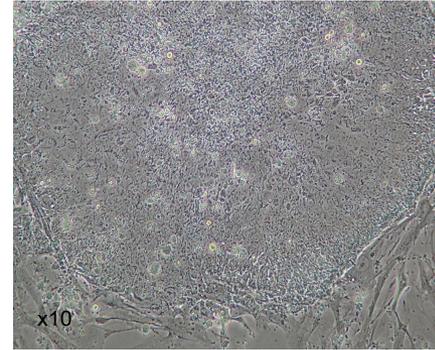
Passage 1



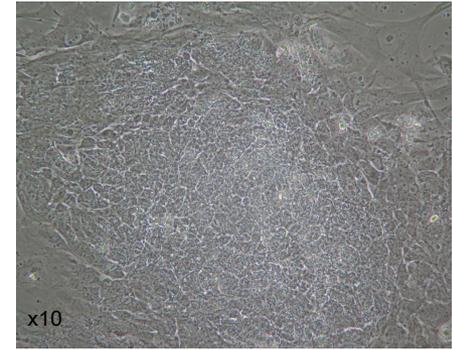
Passage 2



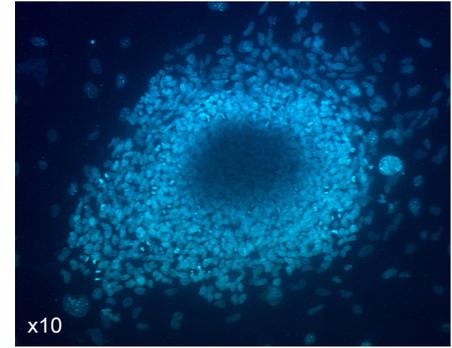
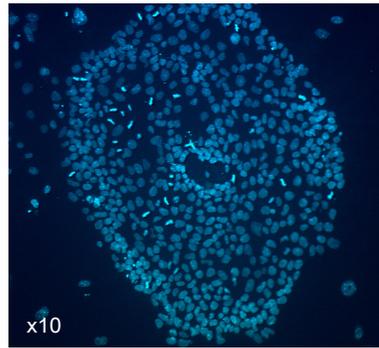
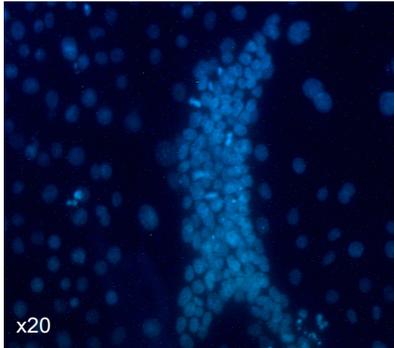
Passage 4



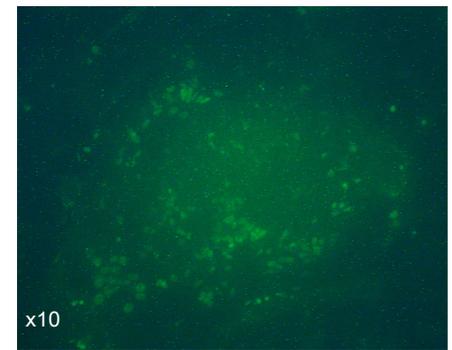
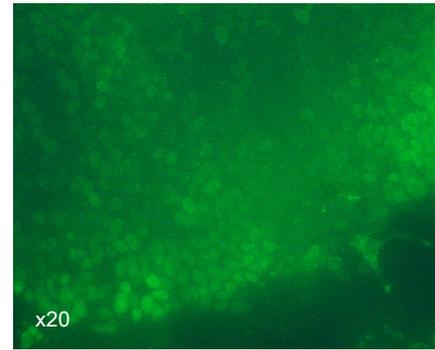
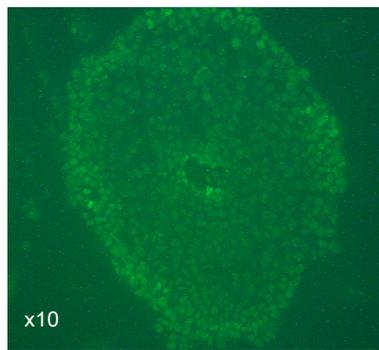
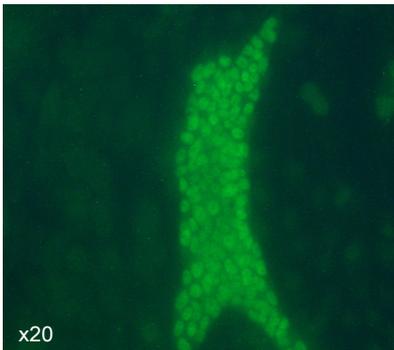
Passage 6



Hoechst



Anti-Oct4



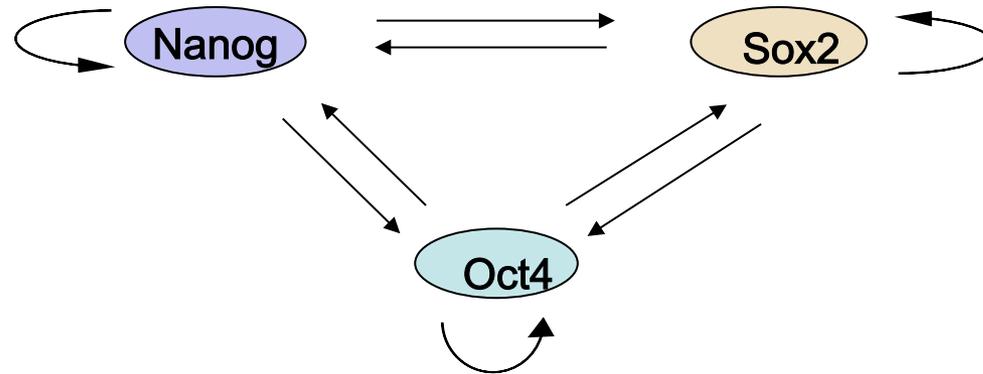
- Différenciation accompagnée d'une perte d'expression du gène *Oct-4*
- Conditions de culture ne permettent pas le maintien de l'autorenouvellement

2



# Stimulation de l'autorenouvellement des cellules blastocytaires

La dérivation de cellules ES dépend de l'adaptation des cellules souches du bouton embryonnaire aux conditions de culture *in vitro*.

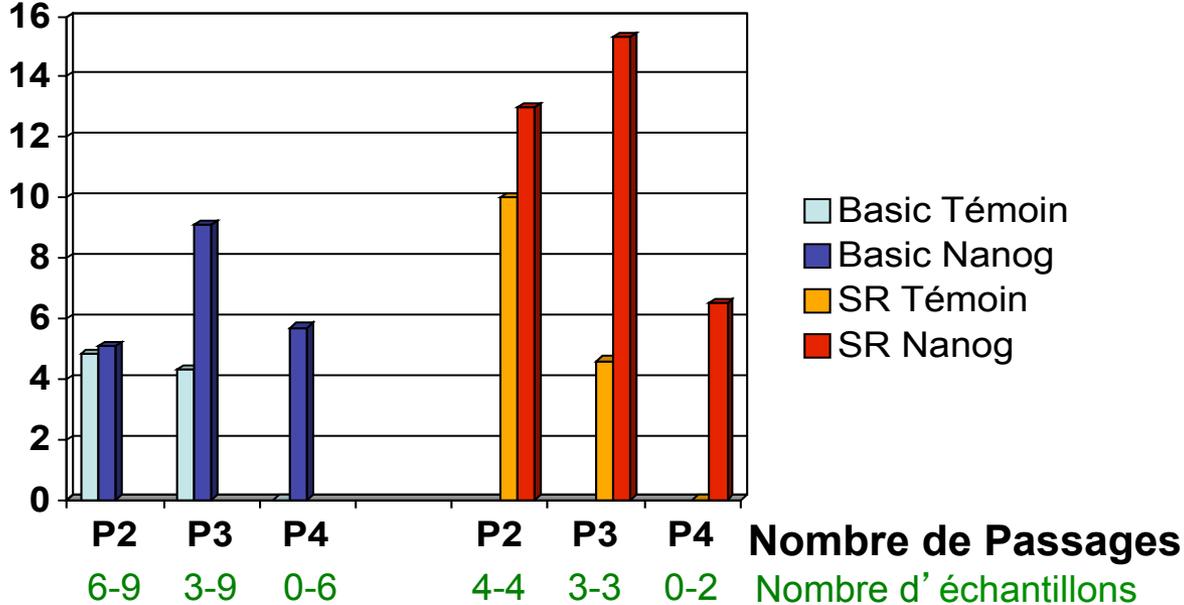


Transduction protéique via le facteur TAT

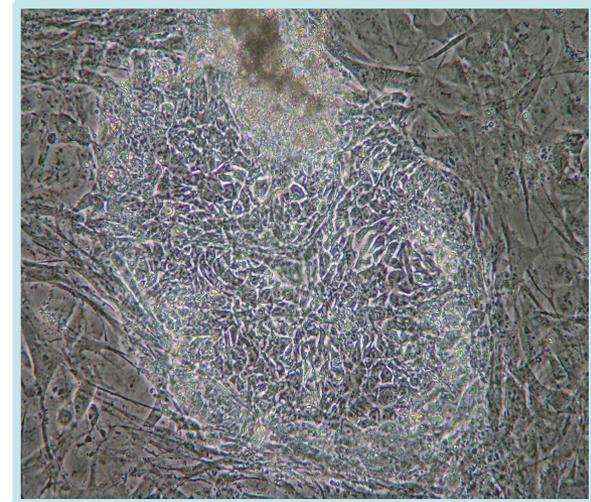
# Surexpression des gènes d'autorenouvellement : transduction protéique via le facteur TAT

Transduction de cellules blastocytaires de lapin  
par TAT-Nanog

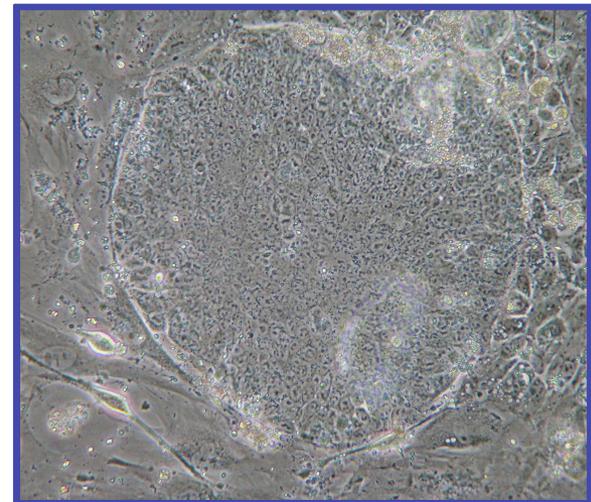
Nombre de  
Colonies



==> Augmentation de la capacité des cellules :  
- à former de nouvelles colonies  
- à se maintenir en culture



Colonie P2 en milieu Basic Témoin



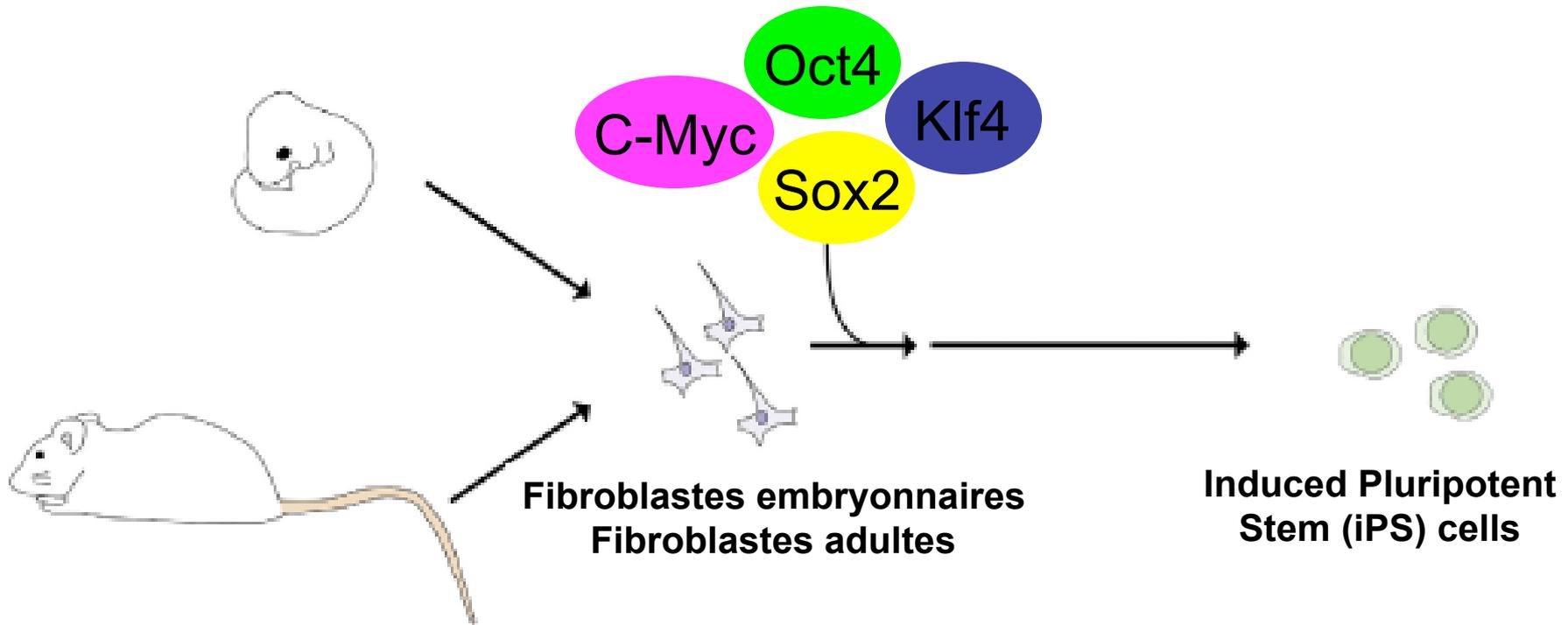
Colonie P2 en milieu Basic Nanog

3



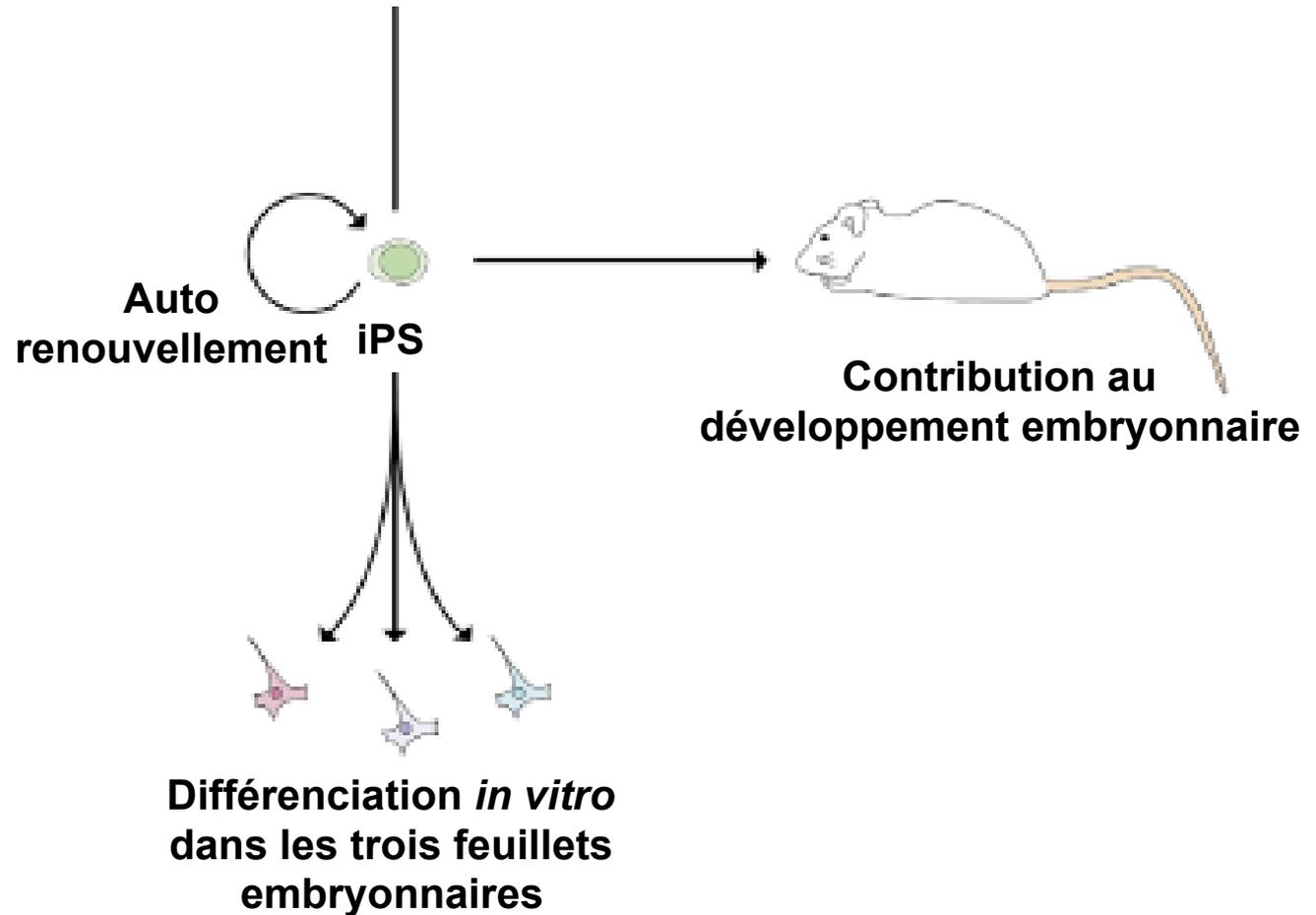
# Reprogrammation de fibroblastes en cellules souches pluripotentes

Vecteurs rétroviraux dérivés de MoMuLV



# Caractéristiques des cellules iPS

Ré-expression des marqueurs de pluripotence  
et modifications épigénétiques



# Obtention de cellules iPS de lapin

Vecteurs de Yamanaka  
dérivés du MuLV

Transfection du  
récepteur rétroviral  
murin: Slc7a1

Infections rétrovirales  
Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc  
(virus écotropes  
produits par les cellules Plat-E)

Fibroblastes de peau



Culture

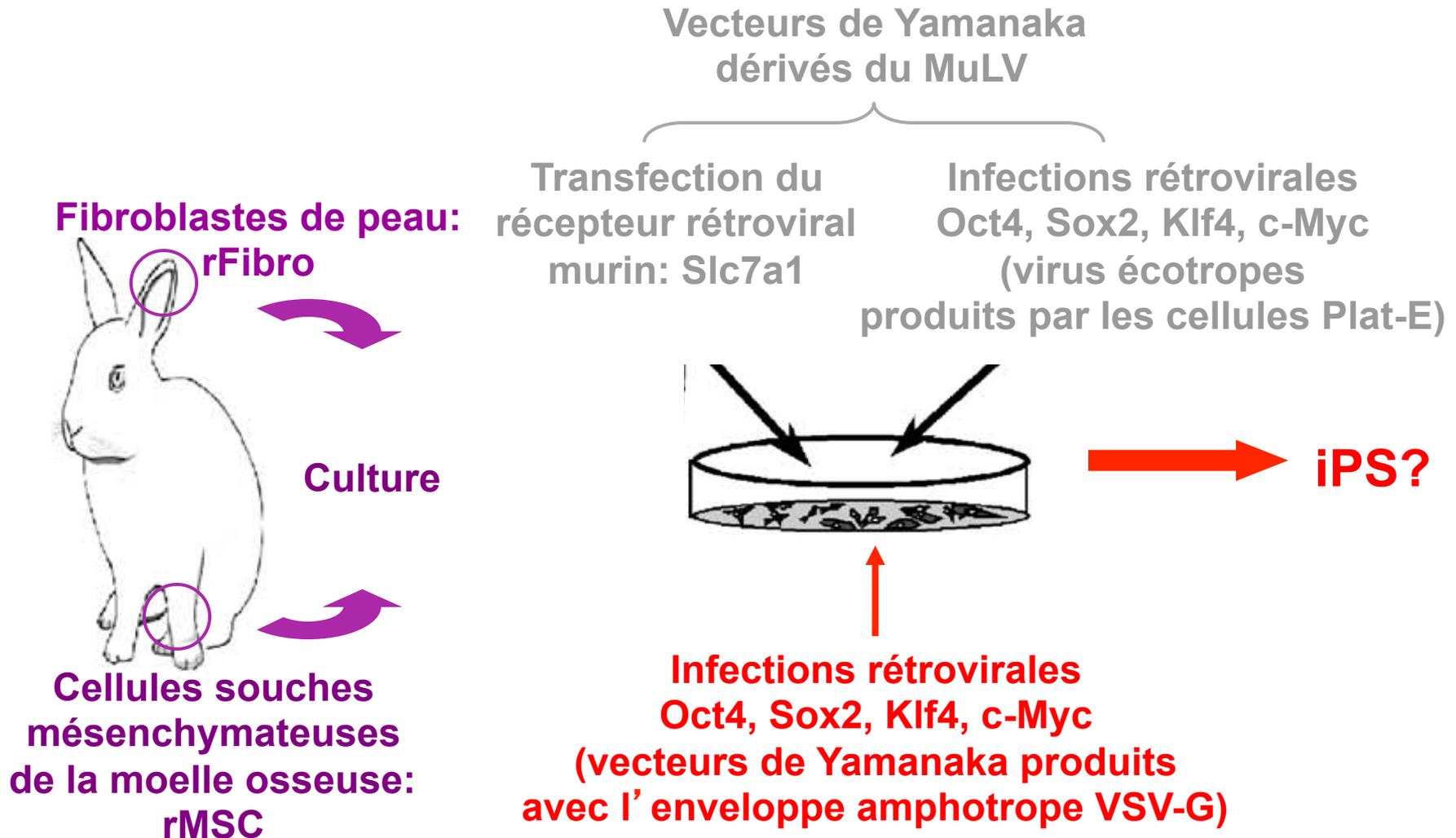
Cellules souches  
mésenchymateuses  
de la moelle osseuse



iPS

Fibroblastes embryonnaires

# Obtention de cellules iPS de lapin: expériences préliminaires



**Fibroblastes embryonnaires murins: MEF**

J0:  
Transfection  
293T

J2/J3:  
Infection  
fibroblastes

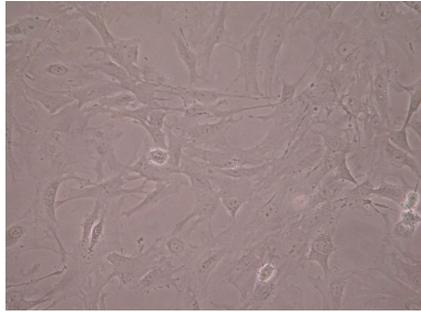
J6:  
Test  
infection

J9:  
Ensemencement  
sur feeders

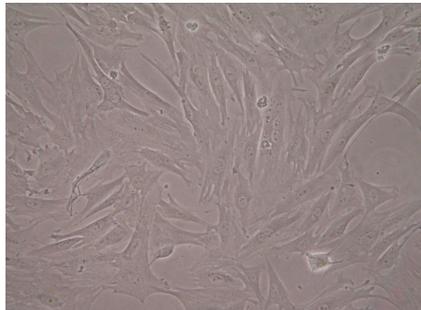
J10:  
Milieu ES  
Souris ou lapin

J15 à J25:  
Apparition  
des colonies

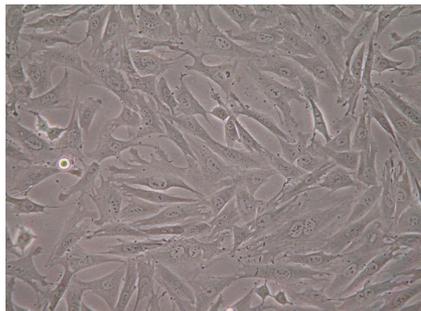
J19 à J29:  
Repiquage P1  
des colonies



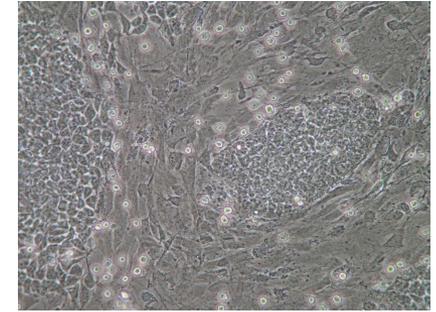
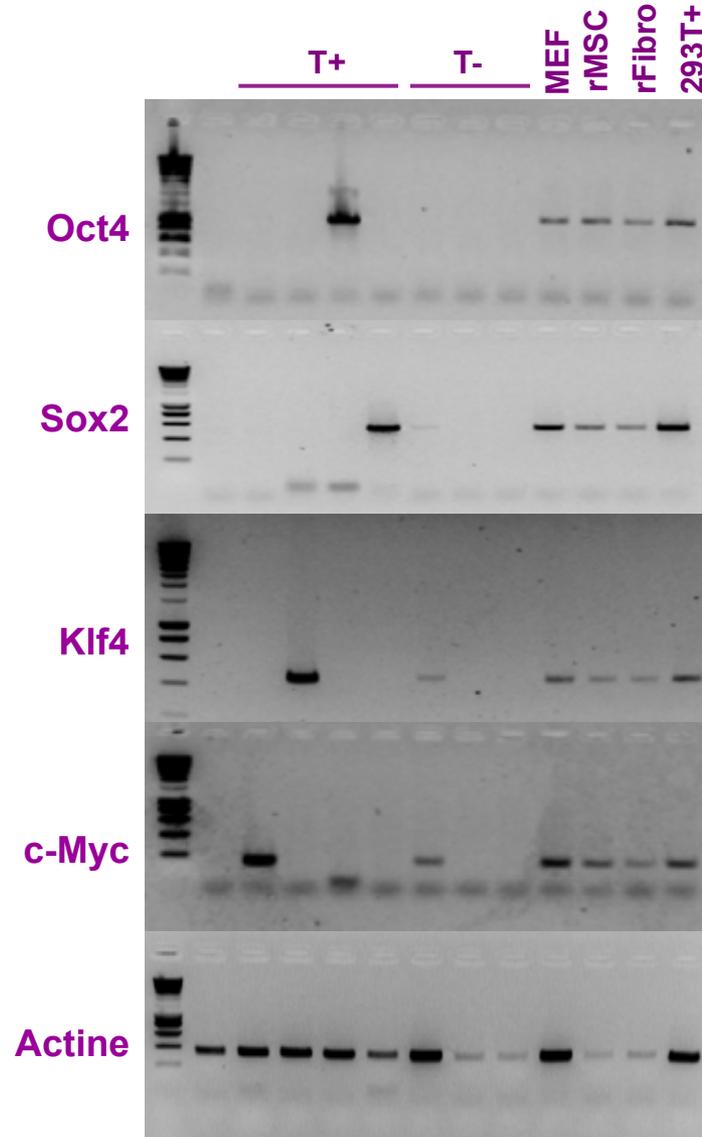
MEF129 P4



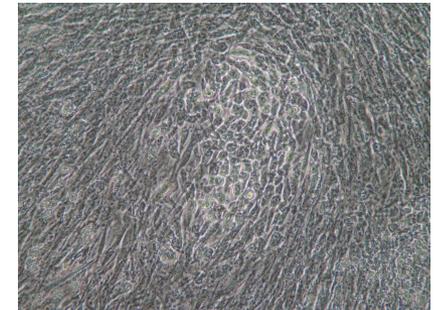
rMSC P4



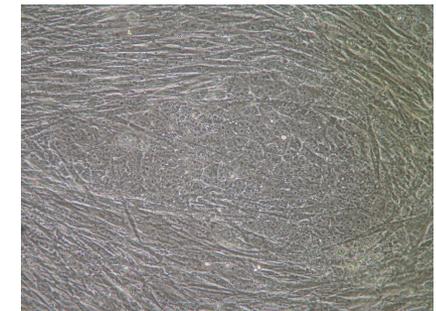
rFibro P5



Colonie MEF



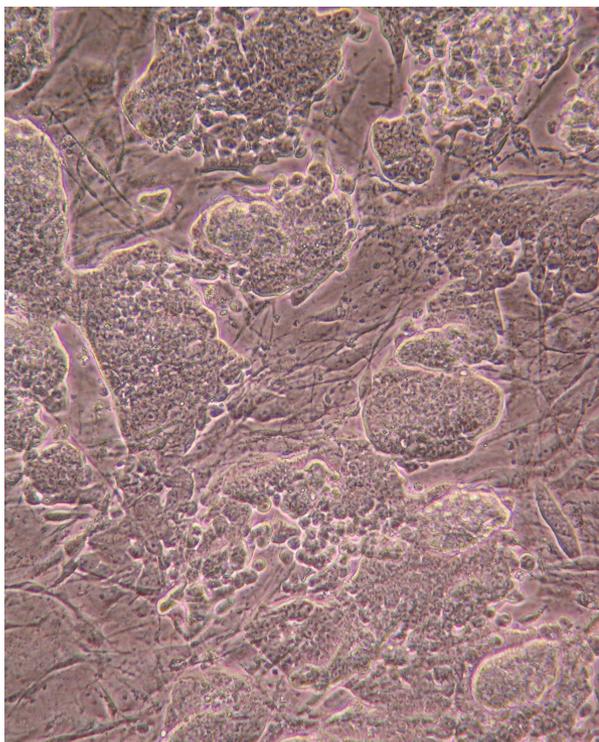
Colonie rMSC



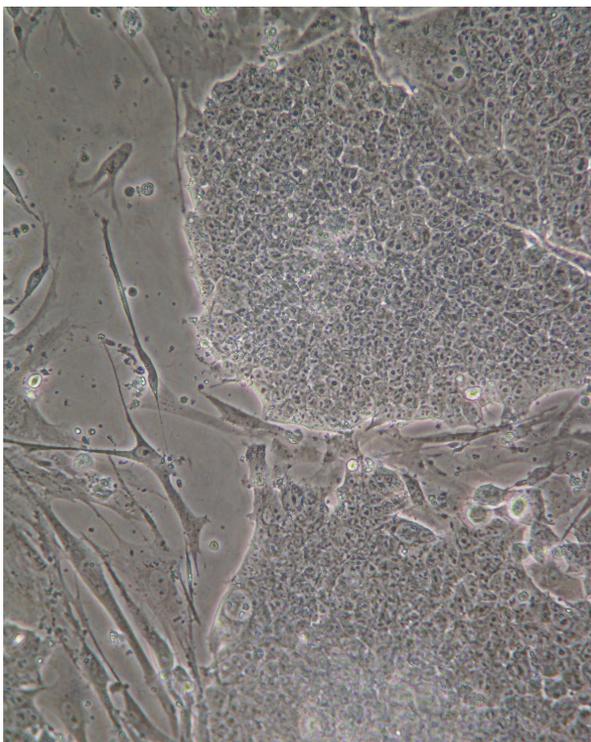
Colonie rFibro

Type cellulaire	Nombre de colonies P1	Morphologie	Activité Phosphatase Alcaline	Intégration des 4 provirus	Expression des 4 transgènes	Marqueurs SSEA-1 ou Tra-1-81	Activation des endogènes
MEF	90	43	24	18	9	9	?
rMSC	546	98	32	15	3	3	?
rFibro	332	100	14	5	0	0	0

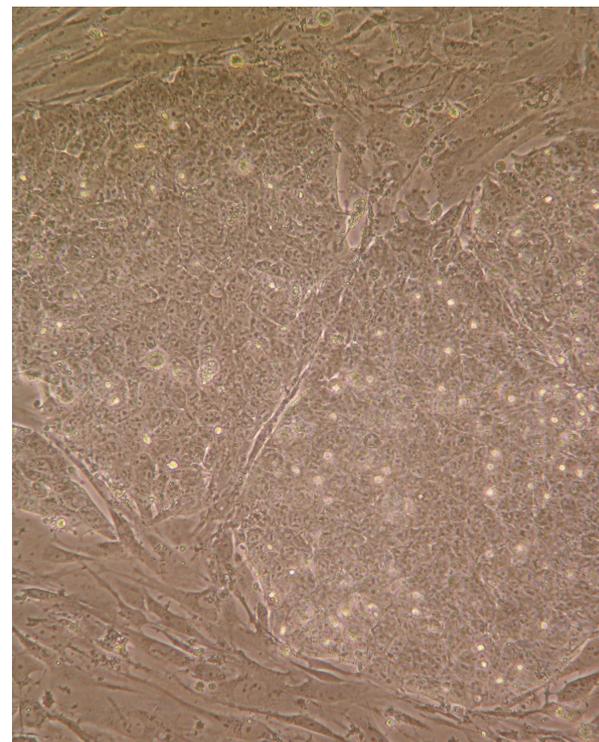
**Clone MEF**



**Clone rMSC**

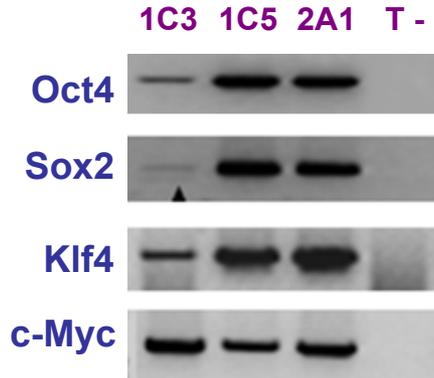


**Clone rFibro**

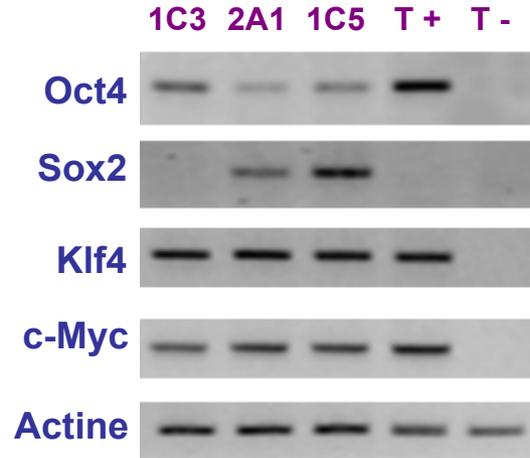


# Analyse des clones rMSC

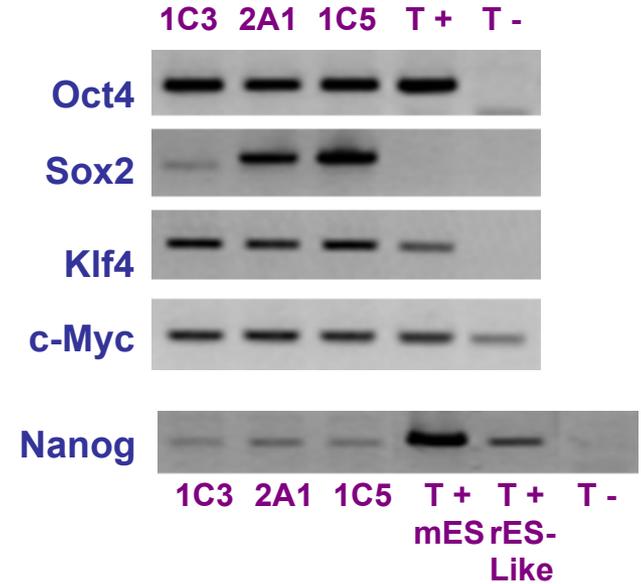
## Intégration des provirus



## Expression des transgènes

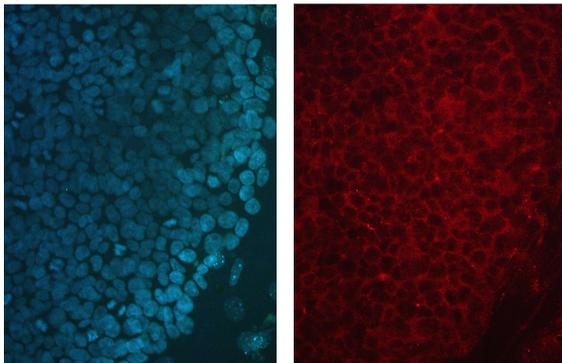


## Expression des endogènes

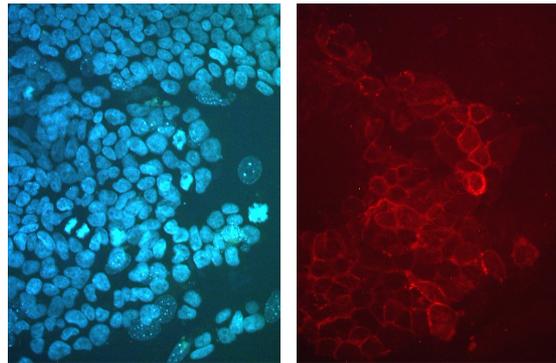


## Clone rMSC 2A1: Expression des marqueurs de surface

### Tra-1-81



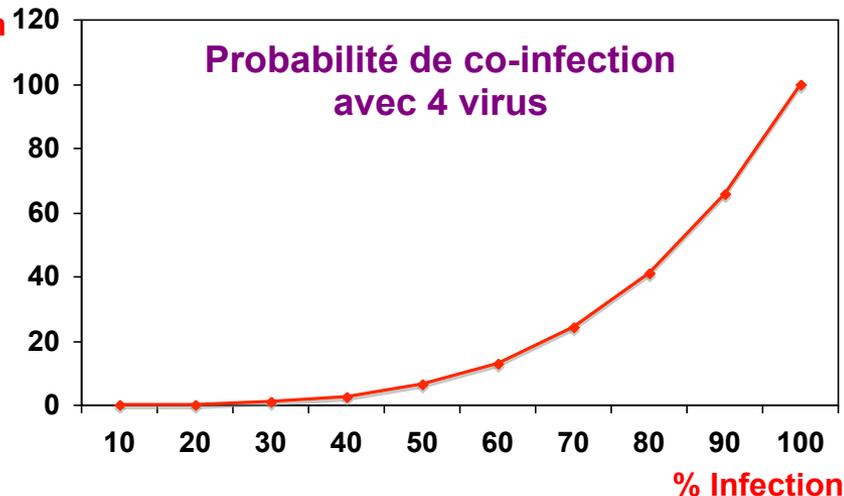
### SSEA-1



**Estimation du taux d'infection  
(rétrovirus amphotrope GFP):**

**MEF: 17%**  
**rMSC: 43%**  
**rFibro: 64%**

**% Co-infection  
avec 4 virus**

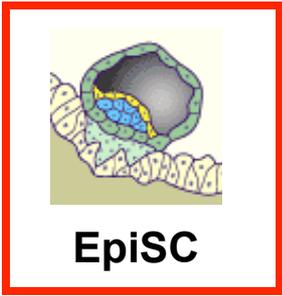


**Optimisation du taux d'infection:**

- ==> Expression du Récepteur Viral Ecotrope Murin par infection lentivirale ou transfection
- ==> Infection avec le Rétrovirus Ecotrope exprimant Oct-4
- ==> Marquage immunocytochimie anti-Oct-4 des cellules infectées

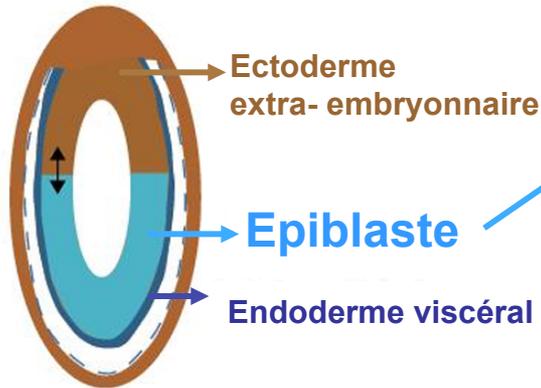
Type Cellulaire	Virus Amphotrope	Virus Ecotrope	Lentivirus + Virus Ecotrope	Transfection au PhCa + Virus Ecotrope	Lipofection + Virus Ecotrope
<b>MEF</b>	<b>30%</b>	<b>100%</b>			
<b>rFibro</b>	<b>25%</b>		<b>100%</b>	<b>5% Transf 10% Infect</b>	<b>30% Transf 28% Infect</b>
<b>rMSC</b>	<b>10%</b>		<b>50%</b>	<b>8% Transf 5% Infect</b>	<b>36% Transf 7% Infect</b>

3



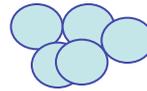
# Dérivation de cellules EpiSC

Œuf cylindre de souris  
Embryon implanté E6.5



**Souris**

Cellules de l'Epiblaste

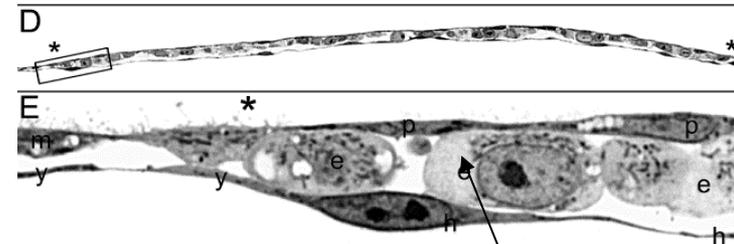


Fibroblastes  
+ Activine  
+ FGF

**EpiSC**

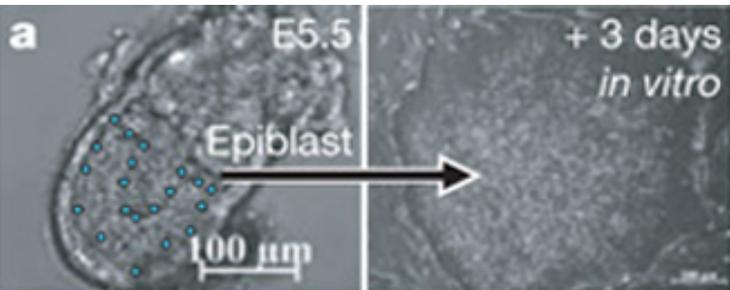
Embryon lapin 6 à 8 jours p.i.  
Isolement des cellules de l'épiblaste par dissection mécanique et enzymatique

**Lapin**



Idkowiak et al., 2007

**Epiblaste**

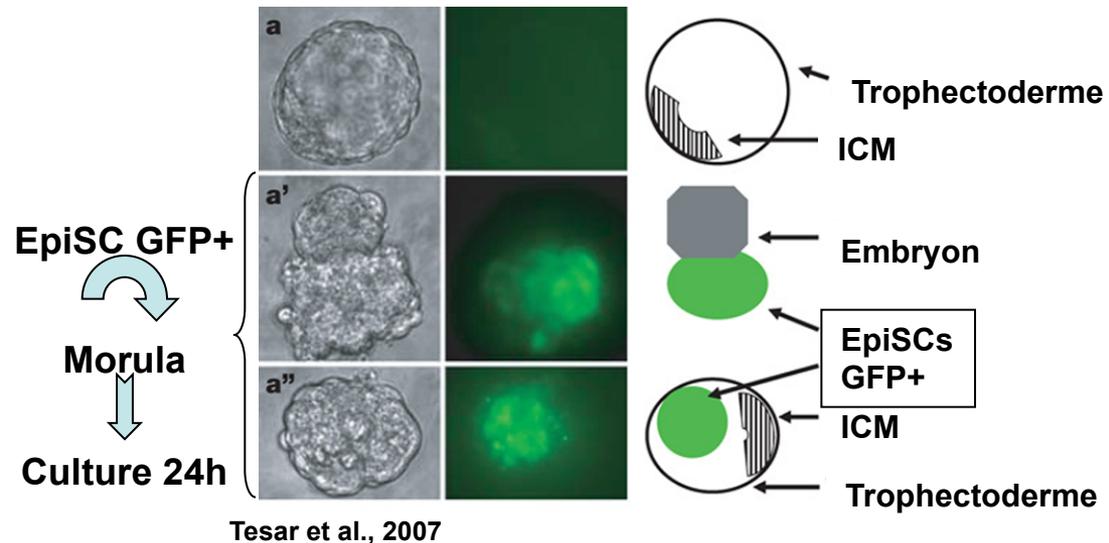
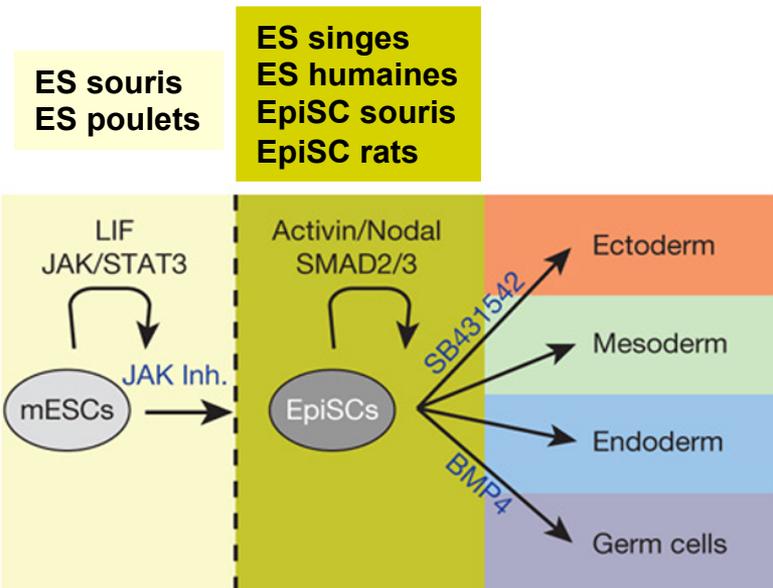


Tesar et al., 2007

# Intérêt des cellules EpiSC chez le lapin

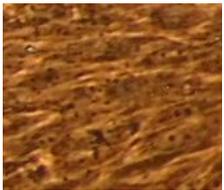
**Avantage:**  
**Activine / Nodal =**  
 voie de signalisation commune  
 aux cellules ES de primates et  
 aux EpiSC de souris et de rats

**Inconvénient:**  
 Absence de colonisation  
 des embryons;  
 Utilisation uniquement comme  
 cellules donneuses de noyaux  
 pour le transfert nucléaire



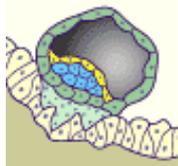
# Perspectives

**But: Obtention de cellules souches utilisables en transgénése chez le lapin et la chèvre**



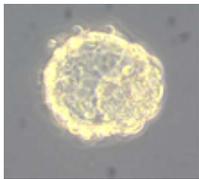
**iPS**

Amélioration des conditions d'infection des fibroblastes  
Obtention de cellules iPS à partir des lapins GFP+  
Test des cellules iPS en transgénése (microinjection, clonage)  
Modification génétique des cellules iPS (recombinaison homologue)  
Amélioration des vecteurs d'expression des gènes



**EpiSC**

Dérivation de cellules EpiSC chez le lapin  
Caractérisation des cellules EpiSC obtenues  
Test des cellules EpiSC en transgénése (microinjection, clonage)



**ES induites**

Test de l'effet des gènes Oct-4, Sox2 et Nanog sur  
l'autorenouvellement des cellules de l'ICM  
Mise au point de la transduction protéique via le facteur TAT  
Test de l'effet des gènes utilisés pour l'induction des iPS