



HAL
open science

Caractérisation par transcriptomique de cellules blastocytaires cultivées et transduites in vitro en vue de l'établissement de lignées de cellules souches embryonnaires (ES)

Véronique Duranthon, Marielle Afanassieff, Catherine Archilla, Suzy S. Markossian, Roger Léandri, Jean Paul Renard, Pierre Savatier

► To cite this version:

Véronique Duranthon, Marielle Afanassieff, Catherine Archilla, Suzy S. Markossian, Roger Léandri, et al.. Caractérisation par transcriptomique de cellules blastocytaires cultivées et transduites in vitro en vue de l'établissement de lignées de cellules souches embryonnaires (ES). 1ères Journées de Restitution des Projets financés sur Crédits Incitatifs en 2004 et 2005 - Département PHASE, Sep 2006, Tours, France. hal-02816736

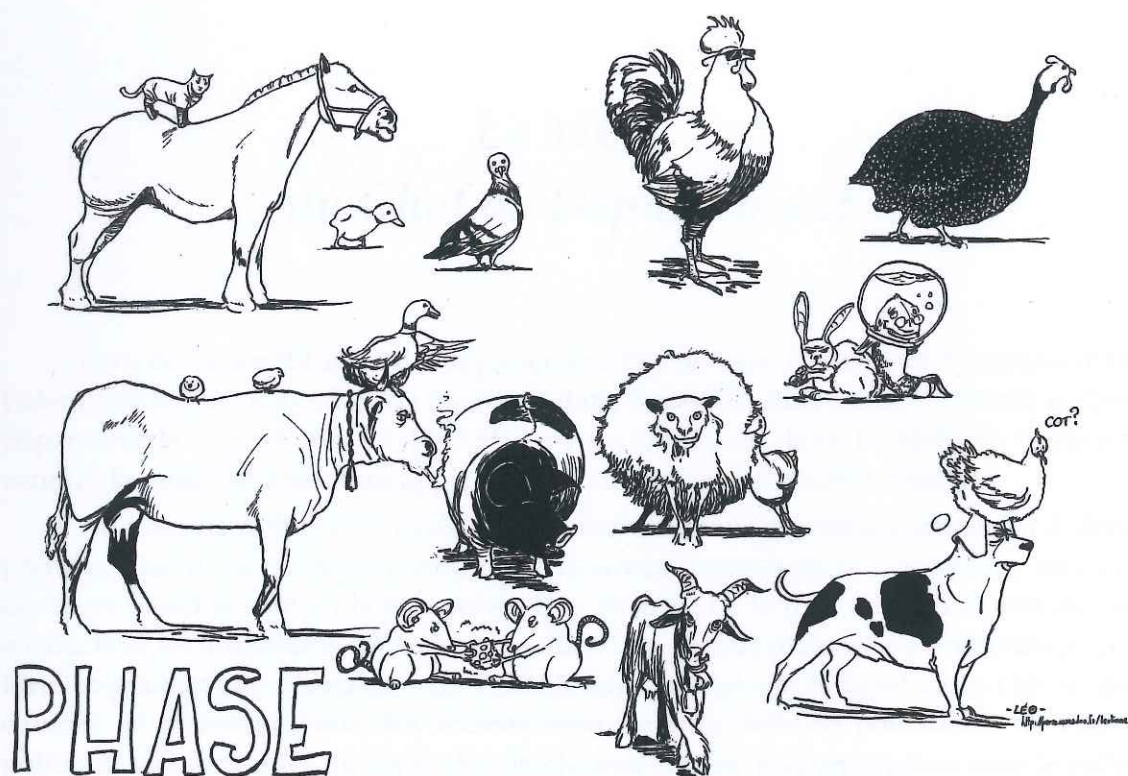
HAL Id: hal-02816736

<https://hal.inrae.fr/hal-02816736>

Submitted on 6 Jun 2020

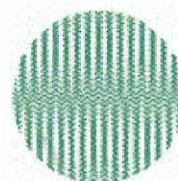
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.



TOURS
14-15 Septembre 2006

**Journées de restitution des projets financés sur crédits incitatifs
du Département de
Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage
en 2004 et 2005**



INRA

Institut National de la Recherche Agronomique

CARACTERISATION PAR TRANSCRIPTOMIQUE DE CELLULES
BLASTOCYTAIRES CULTIVEES ET TRANSDUITES *IN VITRO*
EN VUE DE L'ETABLISSEMENT DE LIGNEES
DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES (ES)

DURANTHON Véronique¹, AFANASSIEFF Marielle², FAURE Catherine¹,
MARKOSSIAN Suzy², LEANDRI Roger¹, RENARD Jean-Paul¹, SAVATIER Pierre²

¹UMR Biologie du Développement et de la Reproduction, INRA, 78352 Jouy-en-Josas.

²USC INRA/INSERM PrimaStem, INSERM U371, 69500 Bron.

veronique.duranthon@jouy.inra.fr

CT4

INTRODUCTION

Les cellules souches embryonnaires ou cellules ES dérivent des cellules du bouton embryonnaire de blastocystes et sont capables de s'autorenouveler, c'est-à-dire de se multiplier indéfiniment en culture sans perdre leur pluripotence. Jusqu'à présent, des lignées de cellules ES ont été isolées uniquement chez les rongeurs et les primates. Les nombreuses tentatives d'isolement de lignées de cellules ES chez les espèces d'intérêt agronomique ont abouti à l'obtention de cellules "ES-like" qui se différencient spontanément en culture après plusieurs jours. Cet échec semble dû aux problèmes d'adaptation des cellules souches blastocytaires aux conditions de culture qui sont insuffisantes pour permettre leur maintien en autorenouvellement. Trois facteurs de transcription indispensables à l'autorenouvellement des cellules ES ont été caractérisés chez la souris et les primates: les facteurs Oct-4, Nanog et Sox-2. Notre stratégie vise donc à surexprimer ces facteurs d'autorenouvellement dans les cellules blastocytaires mises en culture, afin de faciliter l'isolement de lignées de cellules ES chez le lapin. Pour cela, nous développons une technique basée sur la transduction protéique via la protéine TAT du virus HIV. Afin d'analyser l'effet de ces protéines "TAT-fusions", nous nous proposons de comparer les signatures transcriptomiques des cellules naturellement pluripotentes du bouton embryonnaire de blastocystes de lapin, des cellules blastocytaires mises en culture et des cellules blastocytaires transduites *in vitro*, c'est-à-dire cultivées en présence des protéines fusions "TAT-Oct-4", "TAT-Nanog" et/ou "TAT-Sox-2".

RESULTATS

Dans un premier temps, nous avons mis au point les conditions d'isolement et de culture des boutons embryonnaires de lapin, afin d'obtenir de façon reproductible des colonies de cellules blastocytaires morphologiquement identiques aux cellules ES humaines. Ces cellules sont positives pour l'activité phosphatase alcaline et expriment

le gène d'autorenouvellement Oct-4, deux caractéristiques des cellules ES. Elles se divisent très rapidement et doivent être dissociées mécaniquement et réensemencées tous les deux jours. Elles commencent à se différencier spontanément à partir du 5ème passage et cette différenciation s'accompagne de la perte d'expression du gène Oct-4.

Nous analysons maintenant le transcrip-tome de ces cellules "ES-like" obtenues au second passage, c'est-à-dire avant tous signes morpho-logiques ou moléculaires de différenciation. Pour cela, nous utilisons un réseau dédié à l'étude de l'embryon préimplantatoire de lapin. Ce réseau comporte 2000 séquences correspondant à des contigs uniques, exprimées au cours de la période qui s'étend de l'activation transcriptionnelle du génome embryonnaire à l'apparition des premières cellules différenciées au stade blastocyste. A ce stade, l'embryon de lapin comporte deux catégories de cellules : les cellules naturellement pluripotentes du bouton embryonnaire et les premières cellules différenciées du trophoctoderme. Ce réseau est criblé par des cibles complexes correspondant aux transcrits des cellules blastocytaires "ES-like" d'une part, des boutons embryonnaires isolés à partir de blastocystes de lapin et des blastocystes de lapin entiers d'autre part. Les criblages différentiels sont réalisés selon des procédures établies au laboratoire et destinées à optimiser les conditions d'obtention de résultats fiables à partir d'un nombre limité d'échantillons de matériel rare.

CONCLUSION

Ces premiers criblages nous procureront une signature transcriptomique comparative des cellules blastocytaires "ES-like" de lapin et des cellules naturellement pluripotentes du bouton embryonnaire. Cette signature sera ensuite comparée à celle de ces mêmes cellules "ES-like" transduites *in vitro*, afin d'étudier l'effet de différentes molécules fusions "TAT-protéine d'autorenouvellement" sur le maintien de leur pluripotence.