

Isolement de lignées de cellules ES chez le lapin et la chèvre, en utilisant des methodes génétiques de reprogrammation de l'autorenouvellement des cellules blastocytaires

Suzy S. Markossian, Thierry Joly, Pascal Salvetti, Gérard Baril, Pascal Mermillod, Pierre Savatier, Marielle Afanassieff

▶ **To cite this version:**

Suzy S. Markossian, Thierry Joly, Pascal Salvetti, Gérard Baril, Pascal Mermillod, et al.. Isolement de lignées de cellules ES chez le lapin et la chèvre, en utilisant des methodes génétiques de reprogrammation de l'autorenouvellement des cellules blastocytaires. 1ères Journées de Restitution des Projets financés sur Crédits Incitatifs en 2004 et 2005 - Département PHASE, Sep 2006, Tours, France. hal-02819513

HAL Id: hal-02819513
https://hal.inrae.fr/hal-02819513

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.

Jeudi 14 Septembre 2006
09h00 - 19h00

09h00 : Accueil sur le site et Inscription - Pause Café

10h00 : Ouverture par : Philippe CHEMINEAU et Daniel CHUPIN,
analyse des deux appels, présentation d'« animal »
(AMPHITHÉÂTRE C. Danguillaume)

Deux Sessions en parallèle

10h45 - 12h45 : Session C.T. 1

Champ Thématique 1
(Neurobiologie, comportements et adaptations)
AMPHITHEATRE : C. Danguillaume

Modérateurs –
Frédéric LEVY & Marie-Christine SALAÜN

10h45 :
Conséquences émotionnelles de la modification de l'environnement social chez les animaux d'élevage :
Marie-Christine MEUNIER-SALAUN,

11h05 :
Réponses physiologiques et comportementales chez la brebis au retrait de son agneau :
Pascal POINDRON

11h25 :
Emotions et activation neuronale :
Elodie CHAILLOU

11h45 :
Succion non nutritive, Système Opioïdergique et relation homme-animal :
Xavier BOIVIN

12h05 :
Expression du saisonnement chez la brebis Mérinos d'Arles en relation avec le génotype du gène codant le récepteur MT1 à la mélatonine et le niveau alimentaire des brebis :
Jacques TEYSSIER

12h25 :
Les ARN interférents dans une région cible du cerveau de la brebis : un nouvel outil pour l'étude des rythmes saisonniers ?
Laurence DUFOURNY

12h45 : Conclusion du CT1 par les modérateurs

12h50 – 14h00 : Déjeuner (buffet sur place)

10h45 – 12h45: Session Muscle

Champ Thématique 4 (MUSCLE)
(Dynamique d'élaboration des tissus et produits animaux)

Salle : Guy MARIE (1er Etage)

Modérateurs -
Patrick HERPIN & Florian GUILLOU

10h45 – 10h50 : Introduction

Caractérisation des cellules satellites :

10h50 :
Caractérisation des cellules satellites :
Pierre Yves RESCAN

Recherche des gènes impliqués dans la myogenèse et l'hyperplasie :

10h55 :
a) Approche longitudinale transcriptomique et protéomique :
Jean-François HOCQUETTE et Louis LEFAUCHEUR

11h10 :
b) Approche comparative truite – poisson zèbre :
Xavier COUSIN
c) Approche du gène candidat simplet :
Xavier COUSIN

Régulation des phénomènes atrophie/hypertrophie (MyoD, Mystatine, IGF)

11h25 :
a) Effet IGF et myostatine :
Jean-Claude GABILLARD

11h32 :
b) Effet du système protéolytique :
Patrick COTTIN

11h39 :
c) MyoD et atrophie :
Julie LAGIRAND

11h46 : Discussion du CT4 (Muscle)

12h50 – 14h00 : Déjeuner (buffet sur place)

TOURS, les 14 et 15 Septembre 2006

PROGRAMME

des Journées de Restitution des Projets Financés sur Crédits Incitatifs (2004-2005)

14h00 – 15h00: Session C.T. 3

Champ Thématique 3
(Digestion, alimentation et valeur des aliments)

AMPHITHÉÂTRE C. Danguillaume

Modérateurs
Michel DOREAU & Jean NOBLET

14h00 :
Impact du ratio lait/aliment sec sur la sensibilité du lapereau à une inoculation expérimentale colibacillaire :
Thierry GIDENNE

Inventaire moléculaire de l'écosystème caecal du lapin : résultats préliminaires :
Laurent CAUQUIL

14h15: Discussion

14h20:
Nouveaux regards sur les fourrages : Mieux connaître leur rythme de dégradation et leur composition en micro nutriments, mieux prendre en compte les pratiques actuelles d'utilisation des fourrages :
René BAUMONT
Discussion

14h35 :
Construction d'un modèle générique de l'intestin grêle :
Philippe LESCOAT

Modélisation détaillée du rumen :
Daniel SAUVANT

14h45: Discussion

15h00 – 17h00: Session C.T. 5

Champ Thématique 5
(Conception de systèmes biotechniques d'élevage et évaluation de leur durabilité)

AMPHITHÉÂTRE C. Danguillaume

Modérateurs
Joël AUBIN & Jacques AGABRIEL

15h00 :
Conceptualisation du fonctionnement des élevages cunicoles et évaluation d'une conduite alternative:
Laurence FORTUN-LAMOTHE

15h15:
Traçabilité de l'alimentation des herbivores :
Sophie PRACHE

15h25: Discussion

15h35 :
Effet de l'état corporel et du niveau alimentaire sur la réponse des brebis limousines à l'effet mâle :
Hervé TOURNADRE

15h45 :
Insémination artificielle de chèvres en lactation en période d'anoestrus profond après un traitement lumineux associé à l'effet mâle :
Maria-Teresa PELLICER-RUBIO

15h55: Discussion

16h05 :
Validation d'un modèle de stress chronique chez la truie gestante :
Elodie MERLOT

16h15 :
Evaluation de l'importance relative des changements d'environnement et/ou de groupe social au sevrage chez le porcelet : mesures comportementales, zootechniques et hormonales
Armelle PRUNIER

16h25 :
Relations entre oestrus et ovulation chez la vache laitière : effets de la production laitière et de l'apport énergétique :
Catherine DISHENAUS

16h35 :
Effets sur la descendance de la lapine juvénile d'un régime hyperlipidique hyper-cholestérolémique :
Pascale CHAVATTE-PALMER

16h45: Discussion

17h05 – 17h30 : Pause café

17h30 – 19h15 : Débat Public :
La place de la physiologie animale et des systèmes d'élevage dans la recherche agronomique :
Animateur : Philippe CHEMINEAU

20h15 : RENDEZ-VOUS AU RESTAURANT :
Le Portofino :
287, Avenue Maginot – 37100 TOURS NORD
téléphone : 02 47 41 79 80
(face au Magasin CAMIF – rond point des Compagnons d'Emmaüs)

Vendredi 15 Septembre 2006
09h00 - 16h30

09h00 – 12h45: Session C.T. 2

Champ Thématique 2
(Reproduction, développement embryonnaire et larvaire, biotechnologie de la reproduction)

AMPHITHÉÂTRE C. Danguillaume

Modérateurs
Danielle MONNIAUX & Pierre-Yves LEBAIL

09h00 : C.T. 2 - Introduction

09h15 :
Identification de gènes sertoliens impliqués dans la régulation de voies de prolifération et de différenciation des cellules de Sertoli chez les vertébrés : évaluation et développement d'une approche de génomique comparé
Florian GUILLOU

09h30 :
Identification *in silico* de gènes spécifiquement exprimés par l'ovocyte chez la souris, la vache, la poule et la truite ; analyse fonctionnelle comparée
Philippe MONGET

09h45 :
Analyse des profils d'expression dans les gonades en cours de différenciation chez la brebis, la poule et la truite
Corinne COTINOT

10h00 :
Système BMP, nouvel acteur de la différenciation gonadique ? Analyse comparée Mammifères-Oiseaux
Stéphane FABRE

10h15 :
Rôle de l'AMP-activated protein kinase (AMPK) dans la reproduction ?
Lucie TOSCA

10h30 :
Système Kisspeptine chez les poissons : effets de peptides mammaliens chez la truite à différents stades de maturation et recherche de GPR54 chez la truite
Anne-Sophie GOUPIL

10h45 – 11h15 : Pause café

11h15 :
Identification et multiplication de spermatogonies souches aviaires à partir de cultures de tubes séminifères en vue de leur purification puis de leur transfert *in vivo*
Jean-Pierre BRILLARD

11h30 :
Transfert nucléaire chez le poisson rouge : Caractérisation et qualité des cellules somatiques donneuses issues des nageoires
Catherine LABBE

11h45 :
Etude du développement musculaire chez les fœtus bovins issus de clonage somatique
Brigitte PICARD

12h00 :
Variabilité individuelle de paramètres biophysiques des membranes des spermatozoïdes : standardisation dans une approche multi-espèces
Michelle MAGISTRINI

12h15 :
Mise au point d'un détecteur automatisé des chaleurs chez la brebis et la chèvre
Nathalie DEBUS

12h30 : discussion générale

12h45 – 14h00 : Déjeuner (buffet sur place)

14h00 – 16h00: Session C.T. 4

Champ Thématique 4
(Dynamique d'élaboration des tissus et produits animaux)

AMPHITHÉÂTRE C. Danguillaume

Modérateurs
Françoise MEDALE & Gérard CABELLO

14h00 : Introduction

14h05 :
Isolement de lignées de cellules ES chez le lapin et la chèvre en utilisant des méthodes génétiques de reprogrammation de l'autorenouvellement des cellules blastocytaires
Marielle AFANASSIEFF

14h20 :
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

14h35 :
Etude des variations du transcriptome mammaire en réponse aux hormones lactogènes à l'aide de microréseaux bovins à ADNc
Laurent GALIO

14h50 :
Evaluation du transfert des contaminants organiques vers le lait
Guido RYCHEN

15h05 :
Recherche de spécificités entre adipocytes issus de différents dépôts adipeux par une approche protéomique chez le Porc et chez la Truite
Florence GONDRET

15h20 :
Recherche de gènes clés de la variabilité de la teneur en lipides intra-musculaires : approche comparée multi espèces (bovin, canard, truite et porc)
Marie DAMON

15h35 :
Expression des UCPs et activité mitochondriale en relation avec les types métabolique et contractile des fibres musculaires chez le lapin et le poulet
Anne COLLIN

15h50 : discussion générale

16h00 – 16h30 : Conclusion et cloture
par Philippe CHEMINEAU

Jeudi 14 Septembre 2006
09h00 - 19h00

09h00 : Accueil sur le site et Inscription - Pause Café

10h00 : Ouverture par : Philippe CHEMINEAU et Daniel CHUPIN,
analyse des deux appels, présentation d'« animal »
(AMPHITHÉÂTRE C. Danguillaume)

Deux Sessions en parallèle

10h45 - 12h45 : Session C.T. 1

Champ Thématique 1
(Neurobiologie, comportements et adaptations)
AMPHITHEATRE : C. Danguillaume

Modérateurs –
Frédéric LEVY & Marie-Christine SALAÜN

10h45 :
Conséquences émotionnelles de la modification de l'environnement social chez les animaux d'élevage :
Marie-Christine MEUNIER-SALAUN,

11h05 :
Réponses physiologiques et comportementales chez la brebis au retrait de son agneau :
Pascal POINDRON

11h25 :
Emotions et activation neuronale :
Elodie CHAILLOU

11h45 :
Succion non nutritive, Système Opioïdergique et relation homme-animal :
Xavier BOIVIN

12h05 :
Expression du saisonnement chez la brebis Mérinos d'Arles en relation avec le génotype du gène codant le récepteur MT1 à la mélatonine et le niveau alimentaire des brebis :
Jacques TEYSSIER

12h25 :
Les ARN interférents dans une région cible du cerveau de la brebis : un nouvel outil pour l'étude des rythmes saisonniers ?
Laurence DUFOURNY

12h45 : Conclusion du CT1 par les modérateurs

12h50 – 14h00 : Déjeuner (buffet sur place)

10h45 – 12h45: Session Muscle

Champ Thématique 4 (MUSCLE)
(Dynamique d'élaboration des tissus et produits animaux)

Salle : Guy MARIE (1er Etage)

Modérateurs -
Patrick HERPIN & Florian GUILLOU

10h45 – 10h50 : Introduction

Caractérisation des cellules satellites :

10h50 :
Caractérisation des cellules satellites :
Pierre Yves RESCAN

Recherche des gènes impliqués dans la myogenèse et l'hyperplasie :

10h55 :
a) Approche longitudinale transcriptomique et protéomique :
Jean-François HOCQUETTE et Louis LEFAUCHEUR

11h10 :
b) Approche comparative truite – poisson zèbre :
Xavier COUSIN
c) Approche du gène candidat simplet :
Xavier COUSIN

Régulation des phénomènes atrophie/hypertrophie (MyoD, Mystatine, IGF)

11h25 :
a) Effet IGF et myostatine :
Jean-Claude GABILLARD

11h32 :
b) Effet du système protéolytique :
Patrick COTTIN

11h39 :
c) MyoD et atrophie :
Julie LAGIRAND

11h46 : Discussion du CT4 (Muscle)

12h50 – 14h00 : Déjeuner (buffet sur place)

ISOLEMENT DE LIGNEES DE CELLULES ES CHEZ LE LAPIN ET LA CHEVRE, EN UTILISANT DES METHODES GENETIQUES DE REPROGRAMMATION DE L'AUTORENOUVELLEMENT DES CELLULES BLASTOCYTAIRES.

MARKOSSIAN Suzy[1], JOLY Thierry[2], SALVETTI Pascal[2], BARIL Gérard[3], MERMILLOD Pascal[3], SAVATIER Pierre[1], AFANASSIEFF Marielle[1]

[1] *USC INRA/INSERM PrimaStem, INSERM U371, 69500 Bron.*

[2] *Pôle Agrosystèmes, Environnement et Production, ISARA, 69000 Lyon.*

[3] *INRA - Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380-Nouzilly.*

afanassieff@lyon.inserm.fr

CT4

INTRODUCTION

Les cellules souches embryonnaires ou cellules ES dérivent des cellules du bouton embryonnaire de blastocystes. Elles possèdent deux propriétés remarquables: (i) elles sont pluripotentes, c'est-à-dire capables de se différencier dans tous les lignages cellulaires composant un organisme adulte; et (ii) elles sont capables de s'autorenouveller, c'est-à-dire de se multiplier indéfiniment sans perdre leur pluripotence. Jusqu'à présent, des lignées de cellules ES ont été isolées uniquement chez les rongeurs et les primates. La difficulté d'obtention de telles lignées chez d'autres espèces réside principalement dans les problèmes d'adaptation des cellules souches blastocytaires aux conditions de culture. Ces dernières doivent être optimisées pour permettre le maintien de l'autorenouvellement des cellules souches. Les différentes tentatives d'obtention de lignées de cellules ES chez des espèces d'intérêt agronomique ont, jusqu'ici, été basées sur les conditions expérimentales utilisées chez la souris et sont restées vaines. Nous avons donc basé notre stratégie sur le développement de méthodes génétiques permettant de promouvoir l'autorenouvellement des cellules blastocytaires mises en culture, dans le but de faciliter l'isolement de lignées de cellules ES chez le lapin et la chèvre.

RESULTATS

Nous avons tout d'abord isolé puis mis en culture des boutons embryonnaires de lapin et de chèvre en utilisant les conditions expérimentales optimales pour l'obtention de lignées de cellules ES de primate. Ces cultures sont réalisées en présence de bFGF sur des fibroblastes embryonnaires de souris inactivés. Nous obtenons ainsi, de façon reproductible, des colonies de cellules compactes, présentant un rapport nucléo-cytoplasmique élevé et des nucléoles clairement visibles. Ces cellules ressemblent morphologiquement aux cellules ES humaines. Elles 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 3ème ou 5ème passage selon l'espèce. Cette différenciation s'accompagne de la perte d'expression du gène Oct-4.

Afin de promouvoir l'autorenouvellement de ces cellules "ES-like" de lapin et de chèvre, nous développons actuellement des technologies permettant de surexprimer des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'autorenouvellement des cellules ES de souris et de primate : les facteurs Oct-4, Nanog et Sox-2. Ces technologies sont basées sur la transduction virale à l'aide de vecteurs d'expression lentiviraux dérivés du SIV et la transduction protéique via la protéine TAT de HIV. Nous avons tout d'abord produit et testé différents vecteurs lentiviraux véhiculant le gène marqueur GFP et défini les conditions d'infection des cellules blastocytaires. Nous obtenons ainsi des cellules "ES-like" de lapin exprimant la GFP. Nous construisons maintenant les vecteurs lentiviraux véhiculant les gènes d'autorenouvellement. Parallèlement, nous avons commencé à tester des milieux de culture contenant des protéines fusions "TAT-Nanog" fournis par le laboratoire de F. Edenhofer de l'Université de Bonn. Nous mettons au point les conditions d'utilisation de ces protéines fusions sur nos culture de cellules "ES-like", afin de pouvoir étudier l'effet de différentes molécules fusions "TAT-protéine d'autorenouvellement".

CONCLUSION

En conclusion, nous obtenons de façon reproductible des cellules "ES-like" de lapin et de chèvre qui présentent une morphologie et des caractéristiques identiques à celles des cellules ES humaines. Nous développons différentes stratégies pour promouvoir l'autorenouvellement de ces cellules et faciliter ainsi l'isolement de lignées de cellules ES chez le lapin et la chèvre.