



Dynago: action des gonadotrophines dans le développement folliculaire

Elia PARADISO³, Linda BEAUCLAIR², Yves BIGOT², Frédéric JEAN-ALPHONSE¹, Anne POUPON¹, Eric REITER¹, Manuela SIMONI³, Pascale CREPIEUX^{1,*}, Romain YVINEC^{1,*}

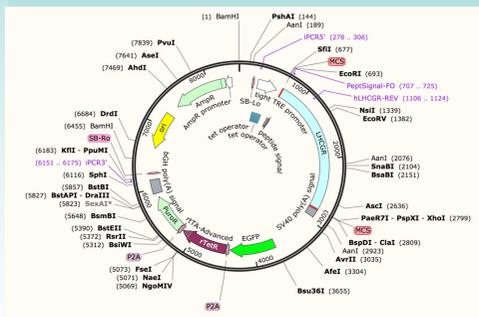
¹Biologie et Bioinformatique des systèmes de signalisation (BIOS)
²Neuroendocrinologie Moléculaire de la Reproduction (NMR) Physiologie de la Reproduction et des Comportements (PRC), INRAE UMR85, CNRS UMR7247, Université de Tours, IFCE.
³Unité d'Endocrinologie, Université de Modène et de Reggio d'Émilie - (Italie)

Problématique

Pendant la phase folliculaire, la FSH stimule la prolifération des cellules de la granulosa du follicule ovarien, puis elle améliore progressivement leur sensibilité à la LH. Cette temporalité d'action des hormones gonadotropes est critique pour le développement folliculaire, mais sa dynamique est encore incomplètement définie. Il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* qui mime la coordination de l'action des hormones gonadotropes FSH et LH. Un nouveau modèle, ajustable à la demande, doit donc être mis au point.

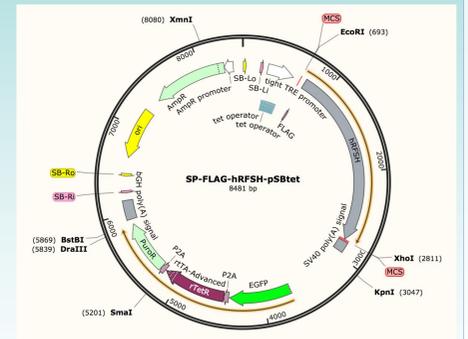
Le projet DYNAGO vise à modéliser l'impact des actions conjointes des hormones gonadotropes FSH et LH grâce à la construction d'une lignée de cellules de granulosa exprimant à l'aide d'inducteurs exogènes les récepteurs de LH et FSH. Nous pourrions ainsi contrôler le niveau d'expression relative des récepteurs, notamment pour reproduire l'évolution phénotypique des cellules de granulosa lors de la maturation folliculaire.

Principe de construction des plasmides bicistroniques



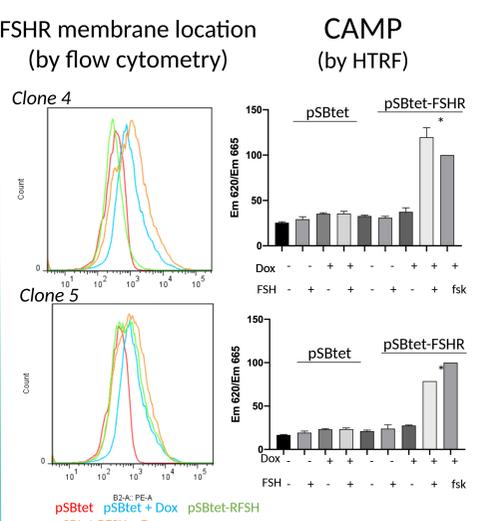
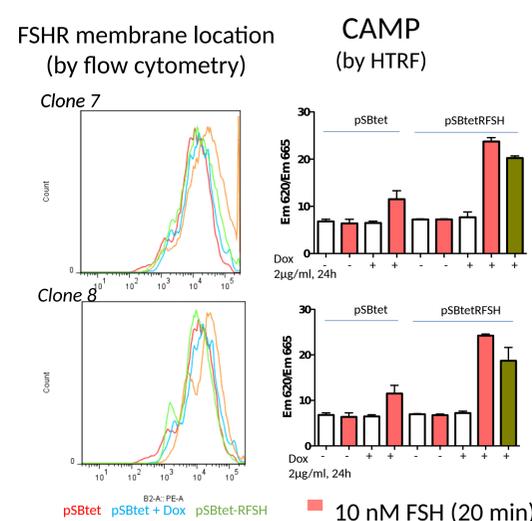
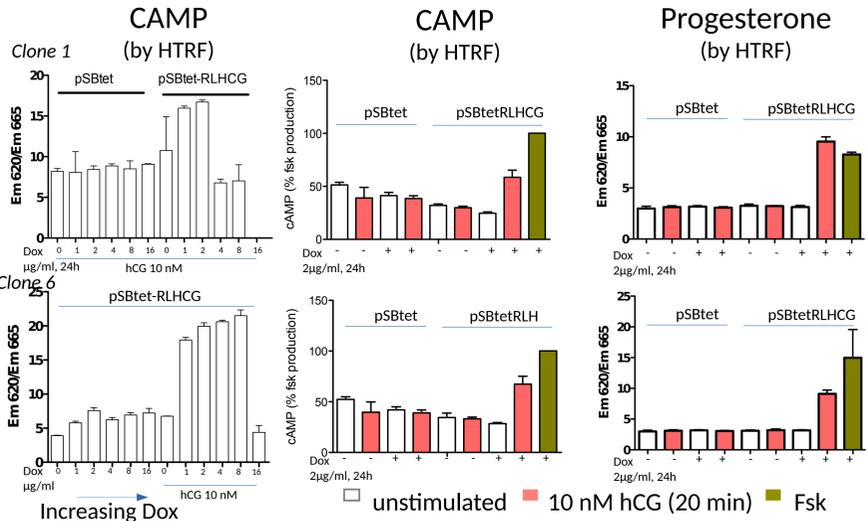
LHCGR

L'ADNc des récepteurs LHCGR et FSHR a été sous-cloné dans le plasmide pSBtet. Ce plasmide permet l'expression inductible de chacun de ses récepteurs, en réponse à la Doxycycline. Par rapport à d'autres systèmes d'expression inductible, ce plasmide présente les avantages suivants :
i/ il permet d'intégrer une partie seulement du plasmide comprenant à la fois le récepteur d'intérêt sous contrôle d'un transactivateur sensible à la Doxycycline, et un gène de résistance à la Puromycine,
ii/ cette cassette est bornée d'éléments de transposition Sleeping Beauty,
iii/ la transfection conjointe du plasmide exprimant le récepteur d'intérêt et de la transposase Sleeping Beauty permet la sélection et l'obtention de clones stables en moins d'une semaine.



FSHR

Preuve de concept : inductibilité de l'expression des récepteurs et réponse AMPc et progestérone

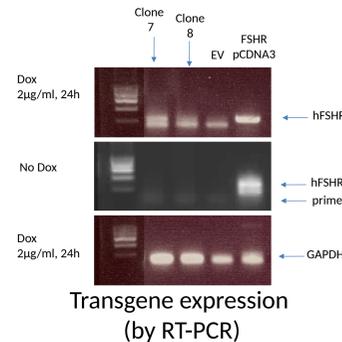


✓ lignée KGN de cellules de granulosa humaines exprimant le RLHCG

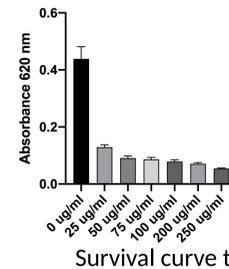
✓ lignée HEK293 exprimant le RFSH

✓ lignée KGN exprimant le RFSH

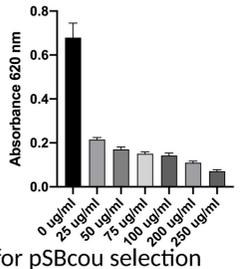
✓ En raison de la crise sanitaire, le maintien des cultures cellulaires de ces lignées n'a pas pu être assuré. Néanmoins, les conditions d'obtention des lignées ont bien été définies



MTT Zeocin after 4 days (HEK293)



MTT Zeocin after 4 days (KGN)



Perspectives

- ✓ Construction de nouvelles lignées (Modène)
- ✓ Nouveau plasmide incluant LHCGR et FSHR
- ✓ Caractérisation fonctionnelle
- ✓ Modélisation dynamique

Remerciements

✓ Nous remercions Le Studium pour le soutien apporté qui a permis le séjour de Manuela Simoni à la PRC, et le département PHASE pour le soutien au projet

