



**HAL**  
open science

# Développement de Nouvelles Stratégies de Conservation et de Restauration des Ressources Génétiques Aviaires basées sur les Cellules Germinales Primordiales (PGCs).

Marina Govoroun

## ► To cite this version:

Marina Govoroun. Développement de Nouvelles Stratégies de Conservation et de Restauration des Ressources Génétiques Aviaires basées sur les Cellules Germinales Primordiales (PGCs).. SYSAAF-Journées techniques interfilière, Dec 2020, en distantiel, France. hal-04276149

**HAL Id: hal-04276149**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04276149>**

Submitted on 8 Nov 2023

**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.

# Développent de Nouvelles Stratégies de Conservation et de Restauration des Ressources Génétiques Aviaires basées sur les Cellules Germinales Primordiales (PGCs).

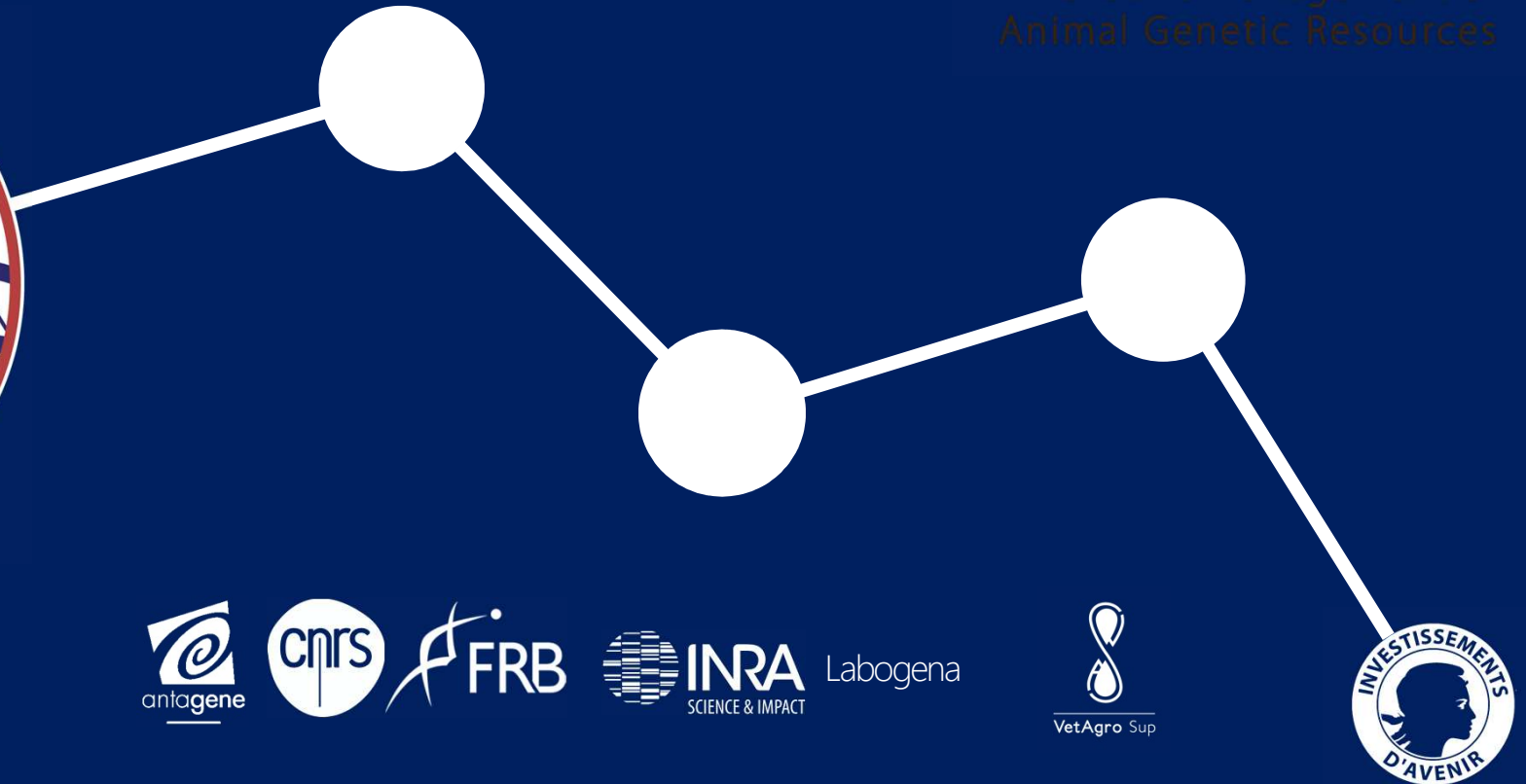
Govoroun Marina, UMR PRC, INRA 37380 Nouzilly

# CRB Anim

Centres de Ressources Biologiques

## VALBIODI

Région centre



Agence Nationale de la Recherche

# ANR



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE DE L'AGRO-ALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT



INRA  
SCIENCE & IMPACT

Labogena

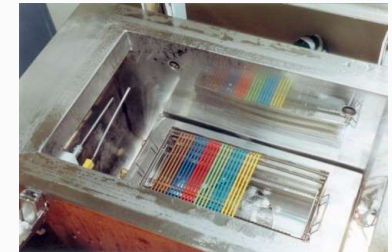


Sysaaf - Journées Techniques Interfilères , 09 décembre, 2020

# Gestion des cellules reproductrices pour assurer la durabilité de la diversité génétique des volailles.



- Biotechnologies de reproduction
- Cryobanque Nationale Aviaire :  
Races anciennes ou rares en danger de disparition, lignées expérimentales, lignées commerciales.
- Conservation des ressources génétiques aviaires est basée sur la cryopréservation de la semence.



*(Blesbois et al, 2006; 2007; 2010, Thélie et al.,2019)*

## Limitations de la Cryobanque du Sperme :

- Le patrimoine génétique des femelles 'est pas préservé



- Restauration du génotype est très longue :

98 % avec la semence congelée



(Blesbois et al., 2011)

# Contraintes pour conserver les cellules reproductives femelles

- L'œuf est télolécithe (grande quantité de vitellus)  
↳ ovocytes et embryons non congelable
- Cryoconservation et greffe des ovaires des poussins d'un jour  
↳ pas assez maîtrisées, compétences en chirurgie, beaucoup de questions restent à résoudre

*(Song & Silversides, 2006, 2007a, 2007b; Liu, 2013; Liptoi et al., 2013).*

# Cellules germinales primordiales (PGCs) : stratégie alternative et complémentaire à la semence

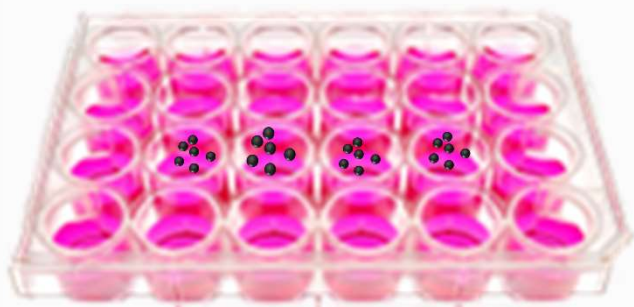
**PGCs** : cellules souches embryonnaires unipotentes prédestinées à se développer en gamètes et qui peuvent devenir pluripotentes dans certains environnements *in vitro*.

- Particularité de migration des PGCs aviaires dans les gonades

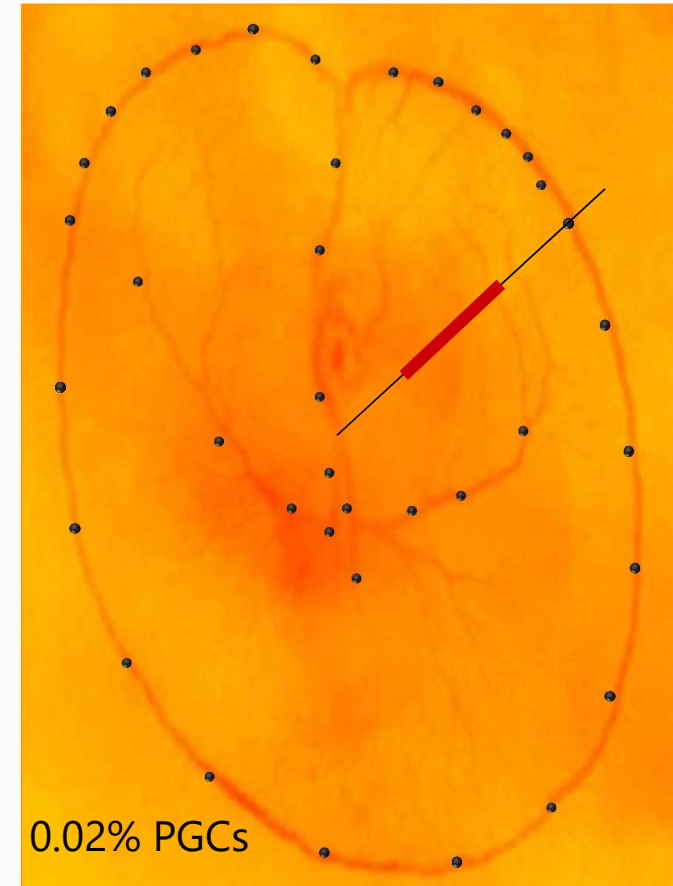
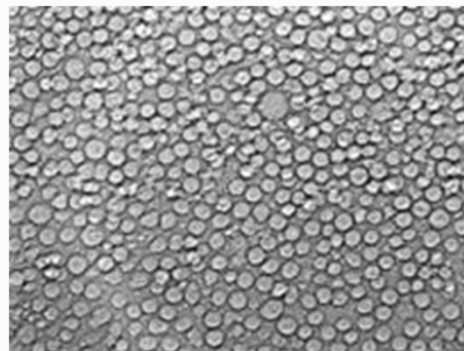


Possibilité d'isoler les PGCs aux stades prégonadiques

- Propagation indéfinie dans un milieu de culture spécialement adapté



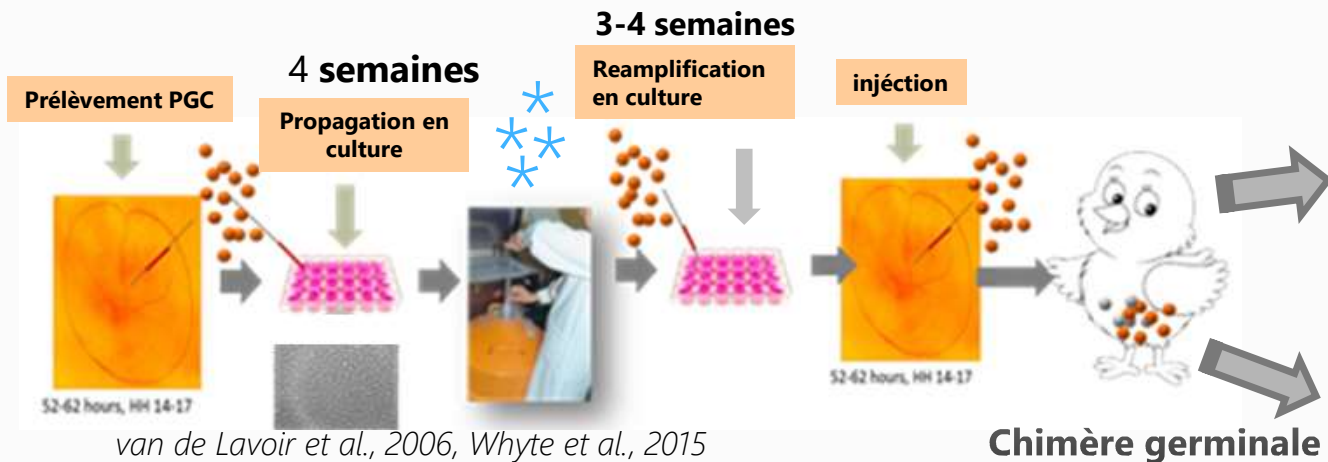
van de Lavoie et al., 2006, Whyte et al., 2015



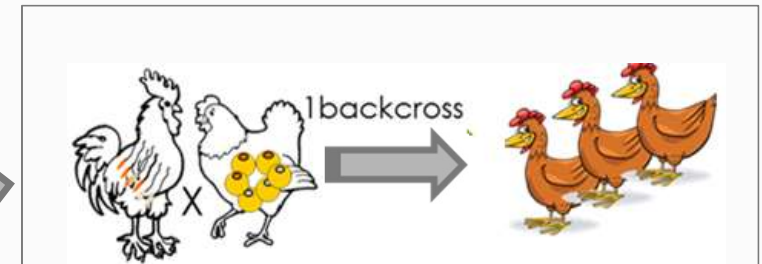
52-62 h, HH 14-17



# Biotechnologie de reproduction basée sur les PGCs propagées *in vitro*



100% genotype donneur



## ➤ Limitations :

- technicité, laboratoire équipé culture cellulaire
- taux de transmission germinale variable 0-100%  
(% (nombre poussins issus de cellules germinales donneuses/nombre poussins nés) x2)

## ➤ Causes : mal connues

- qualité de PGCs donneuses
- compétition cellules hôte-cellule donneuses
- qualité d'injection

➔ Développement d'un hôte stérile



# OBJECTIFS

- Développer le dispositif de conservation et restauration des ressources génétiques aviaires males et femelles basée sur les PGCs
- Etudier l'impact des facteurs susceptible d'influencer la qualité des PGCs sur l'intégrité moléculaire et reproductive de ces cellules : la durée de culture, cryopreservation, sexe des cellules
  - durée de culture, cryopreservation hPSCs, mPSCs, hESC.



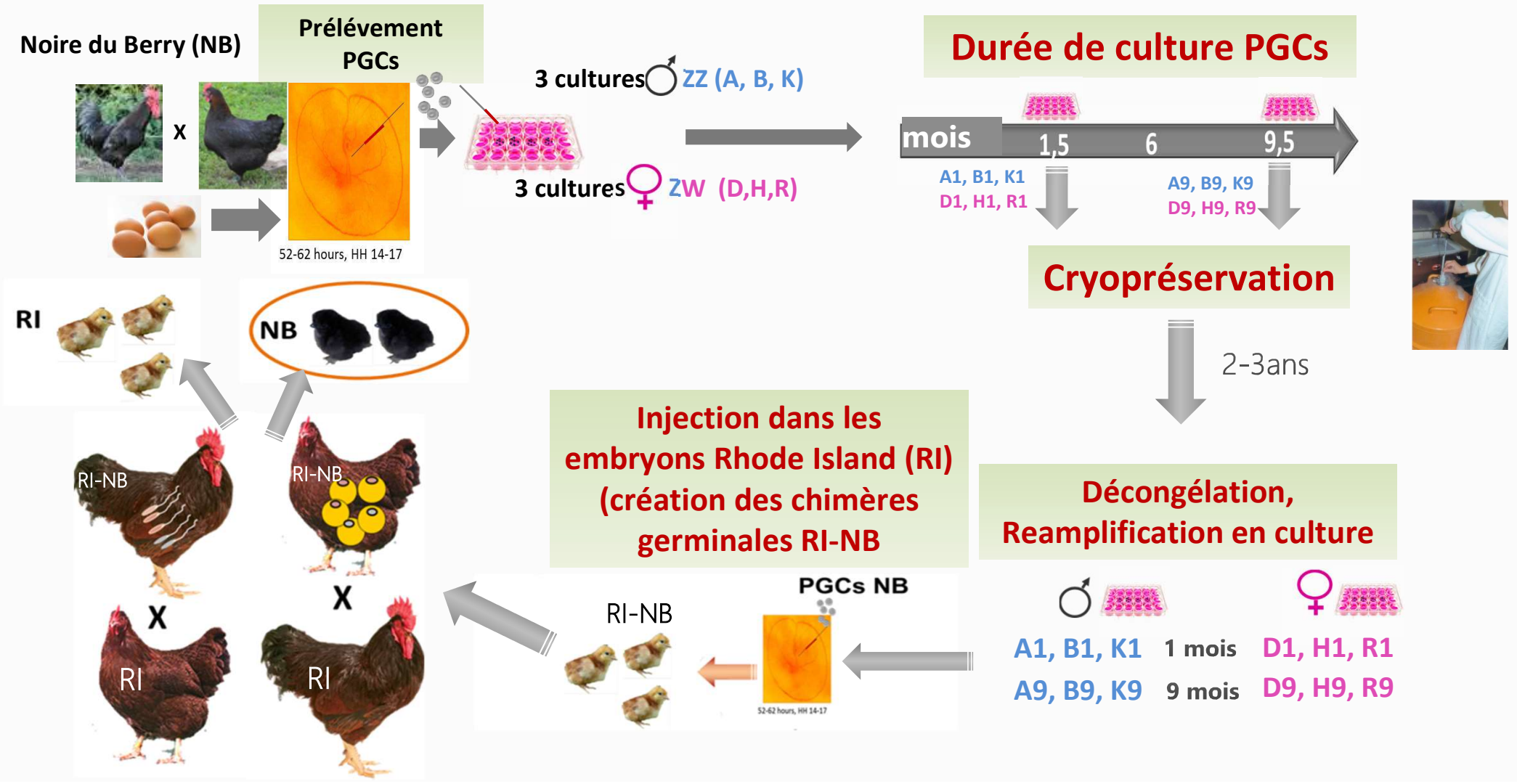
(Garitaonandia et al., 2015; McEwen et al.; 2013; Wagh, 2011; Hawkins K, 2014 )

- PGCs males et femelles sont affectées différemment par environnement *in vitro*  
(Van de Lavoit et al, 2006; Song et al, 2013, Nandi et al.2016, Park and Han, 2013; Macdonald et al, 2010)

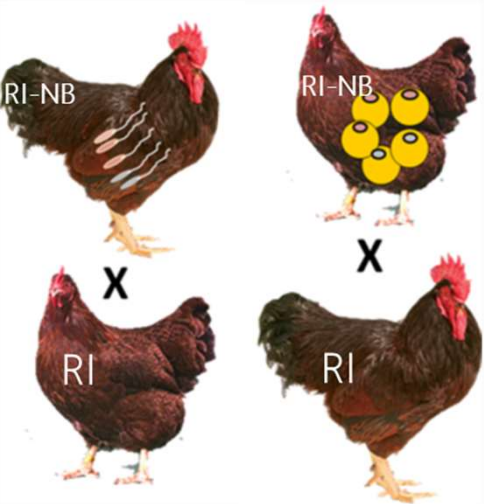
- Notre modèle : La Poule Noire du Berry



# Evaluation de la transmission germinale de cultures des PGCs : Design Expérimental



# Evaluation de la Transmission Germinale de Cultures des PGCs : Résultats



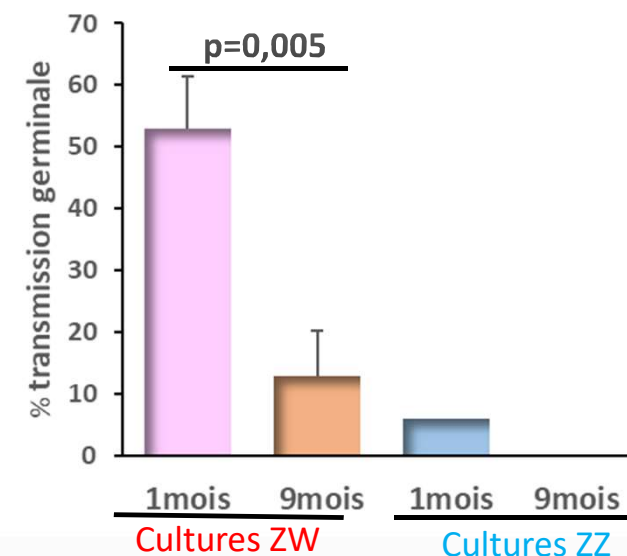
# Transmission germinale des chimères germinales poules



N°Bague	Culture PGCs	Œufs MEI	Nés	NB nés	% NB nés/nés	taux de transmission germinale %
5602	D 1	45	23	5	21,7%	42,0%
5553	D 1	52	46	17	37,0%	74,0%
5603	D 1	40	24	8	33,3%	66,7%
5552	D 1	50	33	2	6,1%	12,1%
5567	H 1	48	42	12	28,6%	57,1%
5528	H 1	41	7	2	28,6%	57,1%
2612	R1	68	33	10	30,3%	60,6%
5513	D 9	52	39	1	2,6%	5,1%
5607	D 9	42	17	1	5,9%	11,8%
4970	H 9	43	36	3	8,3%	16,7%
5612	H 9	43	36	6	16,7%	33,3%
2599	R9	71	52	1	1,9%	3,8%
2601	R9	72	58	2	3,4%	6,9%
5540	A 1	53	34	1	2,9%	5,9%
4959	A 9	1	53	27	0,0%	0%
5507	A 9	14	49	40	0,0%	0%
4964	B 9	4	47	23	0,0%	0%
4966	B 9	7	48	41	0,0%	0%
2619	K9	11	63	47	0,0%	0%
2621	K9	12	57	43	0,0%	0%
2622	K9	13	69	49	0,0%	0%
2624	K9	14	65	50	0,0%	0%
2630	K9	15	70	29	0,0%	0%

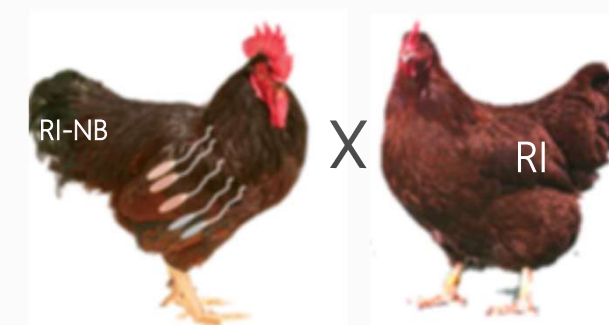
- Culture PGCs NB 1 mois, femelle; embryon receveur RI femelle
- Culture PGCs NB 9 mois, femelle; embryon receveur RI femelle
- Culture PGCs NB 9 mois, mâle ; embryon receveur RI femelle
- Culture PGCs NB 9 mois, mâle ; embryon receveur RI femelle

Taux de transmission germinale moyen NB des chimères germinales poules

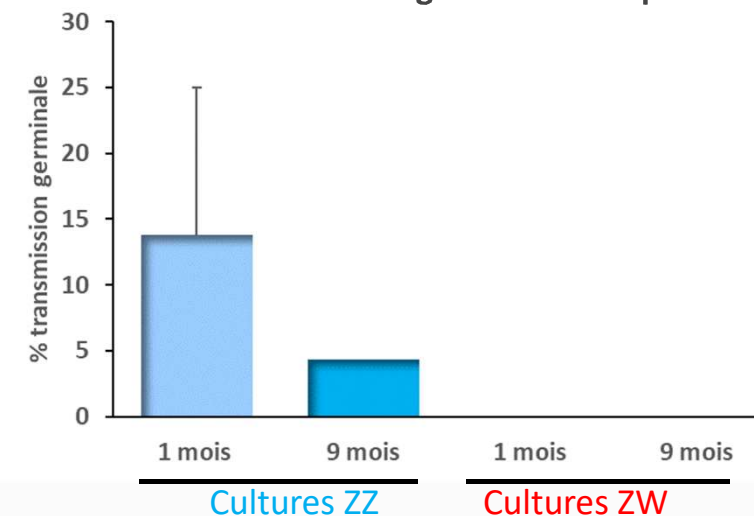


# Transmission Germinale des chimères germinales coqs

N°Bague	Culture PGCs	Œufs MEI	Nés	NB nés	% NB nés/nés	taux de transmission germinale NB %
5505	A 1	189	145	0	0,0%	0,0%
5542	A 1	172	142	0	0,0%	0,0%
5543	A 1	180	125	0	0,0%	0,0%
5593	B 1	163	78	0	0,0%	0,0%
5592	B 1	180	115	0	0,0%	0,0%
2593	K1	132	79	0	0,0%	0,0%
2587	K1	121	28	6	21,4%	42,9%
2592	K1	122	83	2	2,4%	4,8%
2589	K1	131	106	2	1,9%	3,8%
2584	K1	89	52	1	1,9%	3,8%
3240	K1	107	83	0	0,0%	0,0%
5583	A 9	185	138	3	2,2%	4,3%
4965	B 9	149	107	0	0,0%	0,0%
2626	K9	129	74	0	0,0%	0,0%
2623	K9	133	39	0	0,0%	0,0%
5600	D 1	140	68	0	0,0%	0,0%
5601	D 1	137	88	0	0,0%	0,0%
5570	H 1	136	87	0	0,0%	0,0%
3236	R1	138	90	0	0,0%	0,0%
5558	D 9	152	75	0	0,0%	0,0%
4972	H 9	145	95	0	0,0%	0,0%
2642	R9	134	90	0	0,0%	0,0%



Taux de transmission germinale moyen NB des chimères germinales coqs

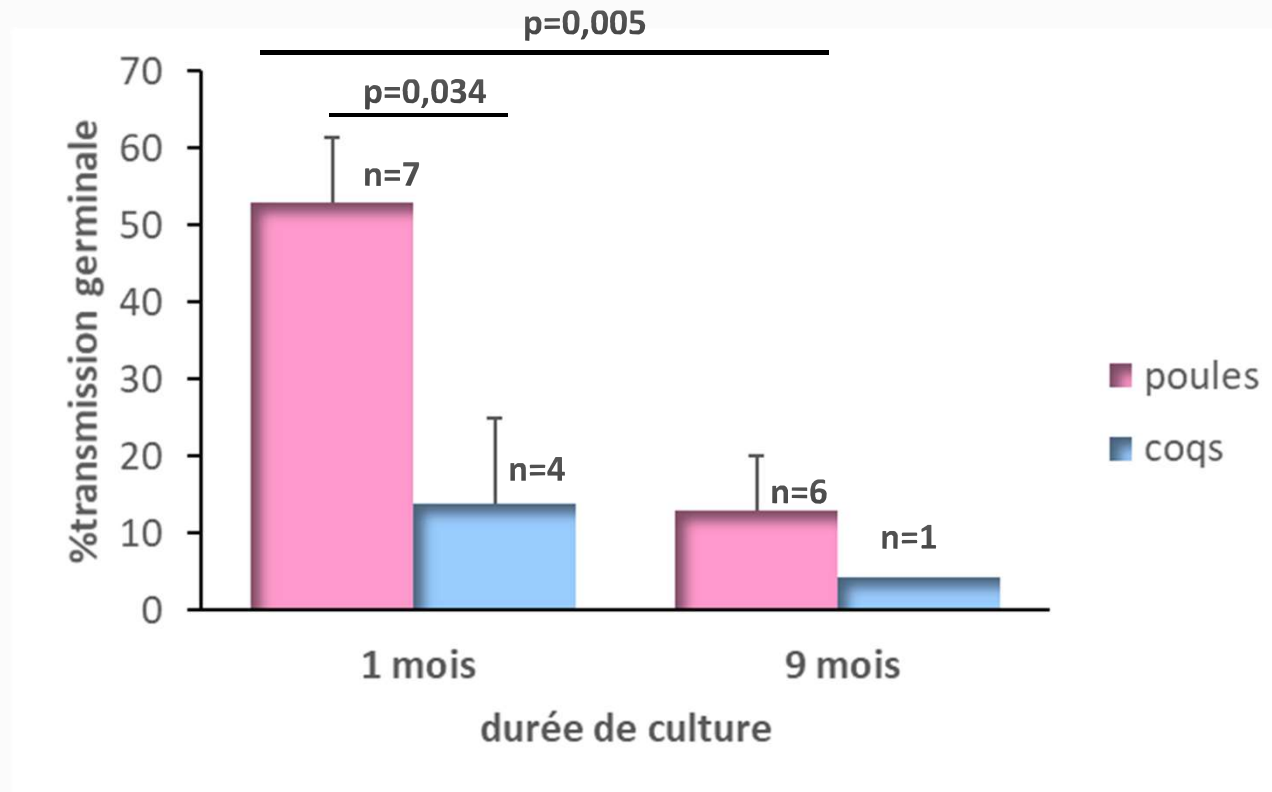


- Culture PGCs NB 1 mois, mâle; embryon receveur RI mâles
- Culture PGCs NB 9 mois, mâle; embryon receveur RI mâles
- Culture PGCs NB 1 mois, femelle ; embryon receveur RI mâles
- Culture PGCs NB 9 mois, femelle ; embryon receveur RI mâles



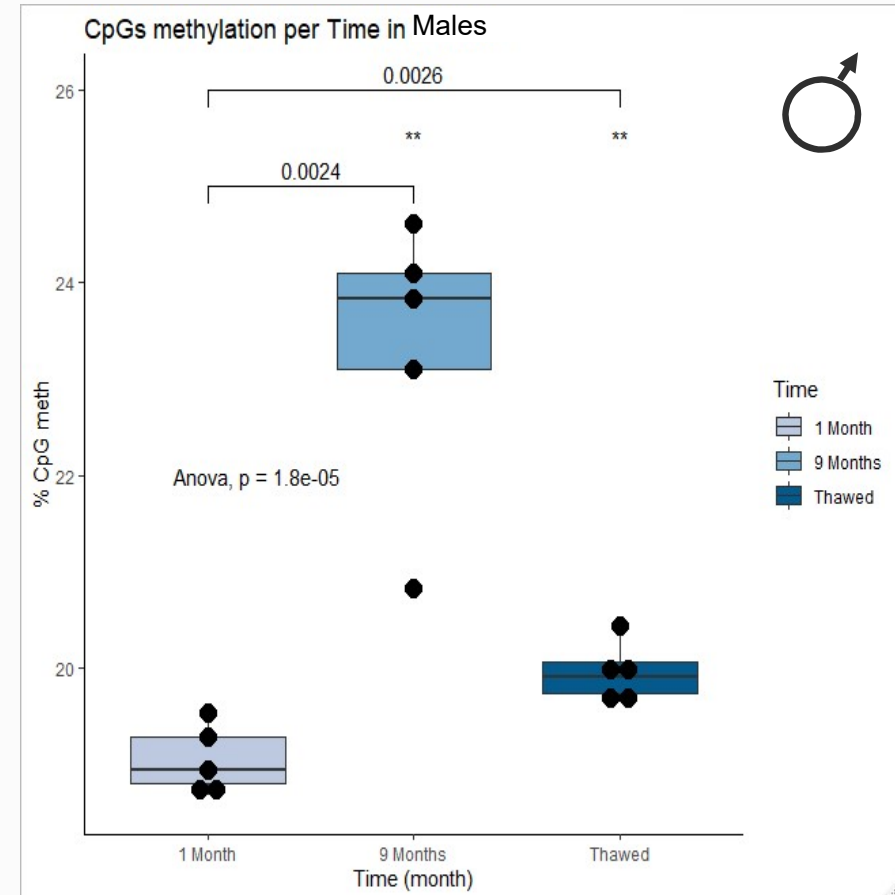
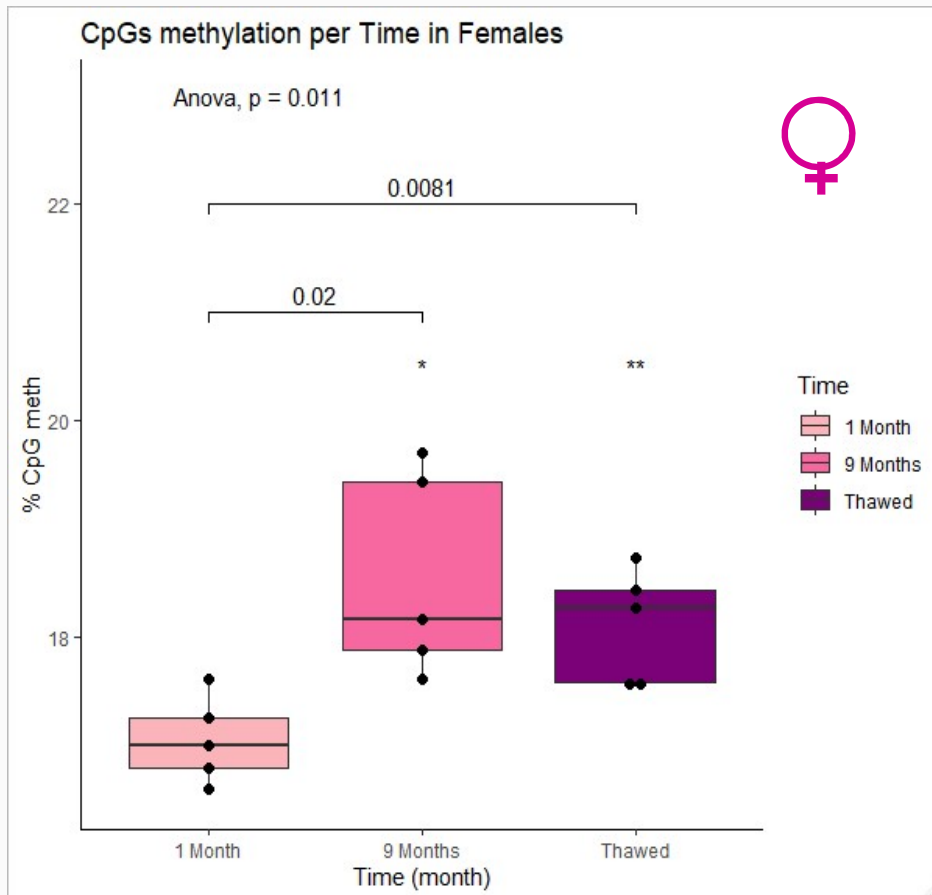
# Chimères germinales femelles transmettent mieux le génotype donneur que les chimères germinales mâles

Germline transmission rate of unisex germline chimera NB

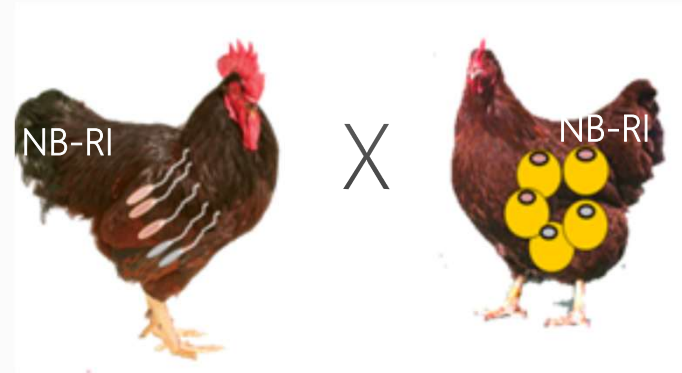




# Effet de la durée de la culture et de la cryoconservation sur la méthylation de l'ADN des PGC: étude RRBS



# Restauration du génotype en une génération en utilisant les chimères germinales



→ 9 poussins noirs/28 nés



Homozygotes?

# Conclusions.



- Nous avons démontré que les cultures de PGCs mâles et femelles de la race «Noire du Berry» dérivées *in vitro*, cryoconservées et stockées pendant 2-3 ans conservent leur potentiel reproductif et montrent un bon taux de transmission germinale après transplantation dans l'organisme receveur.
- Les croisements des chimères germinales mâles et femelles ou insémination des chimères germinales femelles par la semence congelée du génotype des PGCs donneuses doivent permettre la restauration du génotype en une génération.
- PGCs femelles après culture et cryoconservation transmettent mieux que les PGCs mâles
- La culture *in vitro* de longue durée affecte significativement la transmission germinale au moins des PGCs femelles. Ce phénomène est accompagné par les changements du phénotype moléculaire des PGCs.
- Le développement d'un hôte stérile permettrait avoir 100% de transmission germinale

# Pourquoi l'intérêt pour l'édition du génome chez le poulet?

accumulation des données « omiques » dans de  
différents domaines de recherche sur le modèle  
poulet



meilleure vision **des acteurs moléculaires**  
(physiologie et pathophysiologie)



absence d'outils de génomique fonctionnelle  
en France pour le modèle « poulet »

**fonction précise, rôle dans l'expression des phénotypes**



sélection et adaptation des animaux aux conditions d'élevage  
amélioration du bien-être animal et des biotechnologies de reproduction



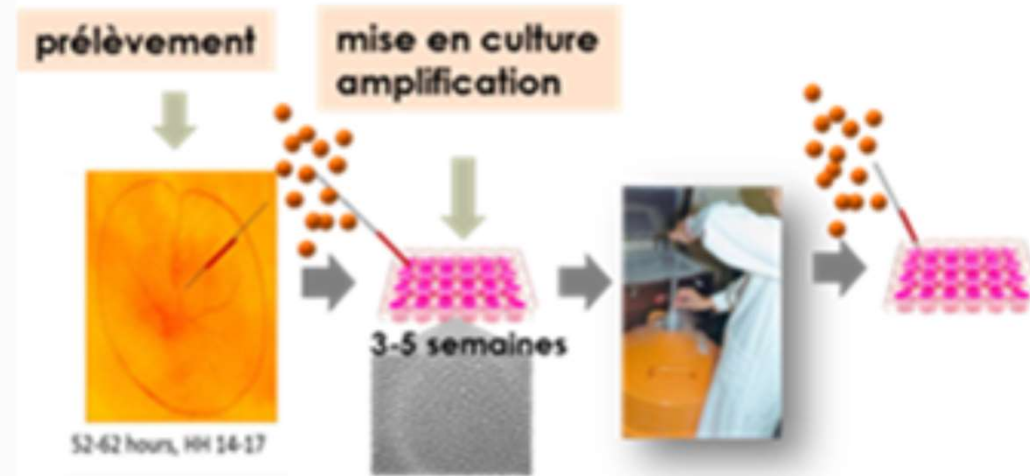
durabilité des élevages des volailles  
sécurité alimentaire  
gestion des ressources génétiques avicoles

## PGCs – véhicule de choix pour l'édition du génome

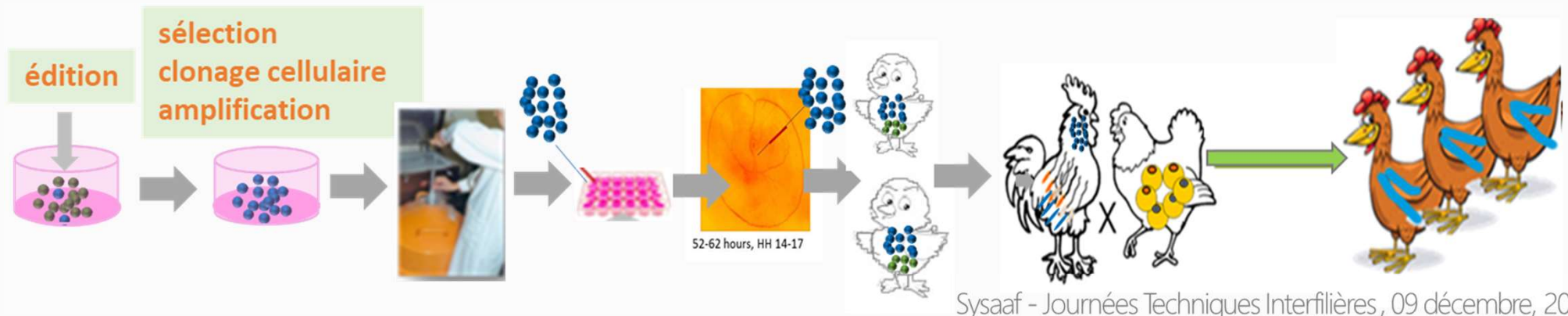
- supportent les transgènes de grande taille
- permettent d'éviter le mosaïcisme d'intégration de la modification
- permettent la pérennisation de la modification du génome via :
  - a) amplification et cryopréservation des PGCs éditées.
  - b) lignées d'animaux édités

# Etapes d'édition du génome chez le poulet

## A) Production des PGCs



## B) Edition/modification des PGCs et obtention d'animaux édités





AAP CI GA-PHASE 2019-2021

# CRISP'CHICK

L'édition du génome chez le poulet pour la validation fonctionnelle de gènes candidats

UMR BOA

UMR PRC

UE PEAT

USC CSC 1361

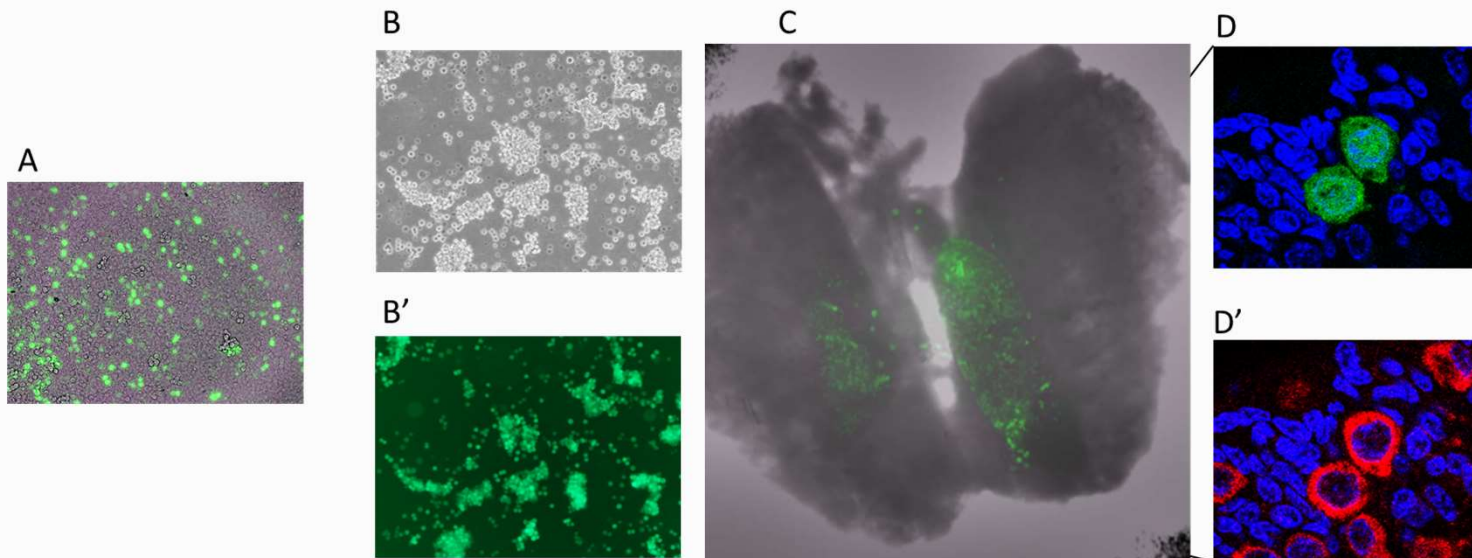
**Coordinatrice : Amélie Juanchich**

## OBJECTIFS

- faire la démonstration de la maîtrise fonctionnelle des outils d'édition du génome chez le poulet.
- caractériser *in vivo* quelques-uns des acteurs moléculaires impliqués dans différents phénotypes d'intérêt (5 gènes d'intérêt sont choisis).

# Premiers Résultats

## A) Création de lignées de PGCs GFP+



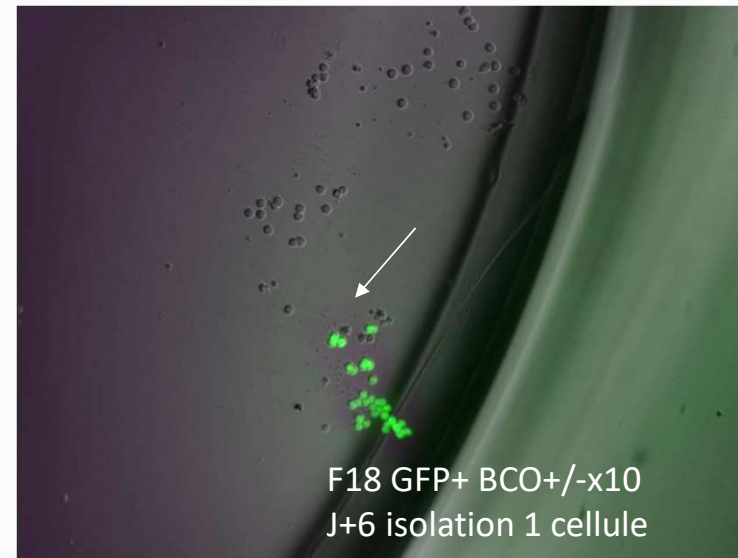
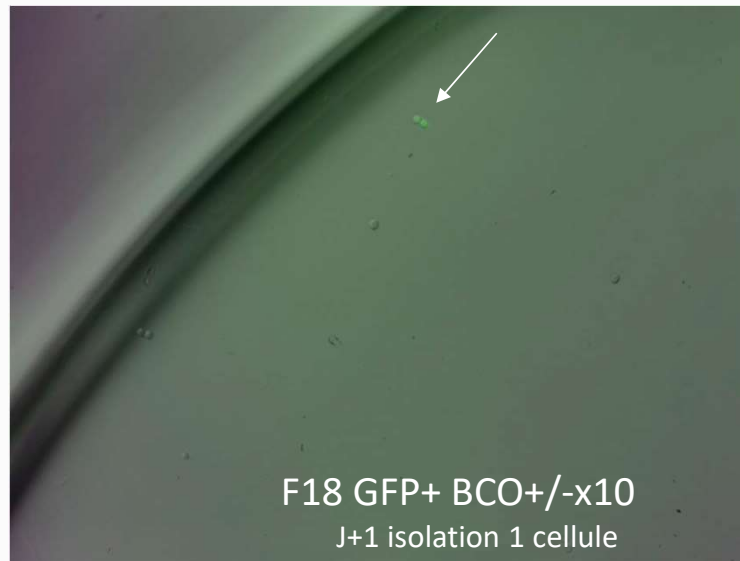
(A) PGCs transfectés avec un plasmide eGFP 24h post-transfection ; (B et B') PGCs exprimant la GFP après sélection antibiotique et 1 mois de culture (B) dans le visible et (B') sous UV pour voir la GFP ; (C) test de colonisation des gonades d'un embryon receveur par des PGCs GFP+ à 9 jours (D et D') immunofluorescence sur coupe des gonades injectées avec les PGCs GFP+ (D) certaines cellules expriment la GFP (en vert) et (D') et ces cellules expriment aussi DAZL (en rouge) qui est un marqueur des PGCs. L'ADN est marqué au DAPI en bleu.

# Premiers Résultats

**B)** Développement des ARNs guides pour le système CRISPR-CPF1 les 5 gènes.

**C)** Production de PGCs GFP+ BCO1+ et sélection des clones, séquençage, choix des clones, amplification des clones, congélation

Clones de PGCs mâles et femelles GFP édités et sélectionnés pour BCO1



Sélection hygromycine et amplification des clones GFP+ BCO+ ou -

**D)** Production des animaux édités pour BCO1 2021

**Culture, congélation  
transmission germinale**

**Sabine Alves**

Aurore Jacques

**Proteomique**

Laura Soler-Vasco

Valérie Labas

**Methylation d'ADN**

Hervé Acloque

Frédérique Pitel

Vincent Coustham

**Analysis Statistique and  
bioinformatique**

Christophe Klopp

Maria Bernard

Christelle Hennequet-Antier

Aurélien Brionne

**Development and caracthérisation  
of PGCs *in vitro* culture**

Collaboration: Mike Mcgrew, Roslin Institute

**WP3 coordinator**

Elisabeth Blesbois

**production des oeufs et élevage**

Joel Delaveau

Christophe Rat

Philippe Didier

**Edition du génome**

Amélie Juanchich

Sabine Alves

Jacky Ezagal

Bertrand Pain

Merci de votre attention

