

**CULTURE A LONG TERME DE CELLULES GERMINALES PRIMORDIALES (PGC)  
COMME INSTRUMENT DE LA CRYOCONSERVATION DE LA DIVERSITE  
GENETIQUE AVIAIRE: ETABLISSEMENT, CARACTERISATION ET QUALITE**

**Bertrand Pain<sup>1,2,3</sup>, Clémence Kress<sup>1,2,3</sup>, Aurélie Fuet<sup>1,2,3</sup>, Franca Rauci<sup>1,2,3</sup>**

1- INSERM, U846, Stem Cell and Brain Research Institute, Bron, France

2- INRA, USC1361, Bron, France

3- Université de Lyon, Lyon 1, UMR S 846, Lyon, France

[Bertrand.pain@inserm.fr](mailto:Bertrand.pain@inserm.fr)

**RÉSUMÉ**

Le maintien de la diversité génétique de la volaille semble être l'un des défis les plus importants pour les années à venir. En effet, il est nécessaire de développer des approches innovantes de biotechnologie de la reproduction qui se doivent être efficaces pour maintenir un réservoir de gènes via la congélation de matériel génétique, en plus de la conservation des animaux vivants. Parmi les méthodologies développées, la cryoconservation du sperme, des cellules blastodermiques et de cellules germinales primordiales sont actuellement les outils les plus prometteurs pour atteindre ces objectifs. En particulier, la culture *in vitro* de cellules germinales primordiales (PGCs) dans plusieurs espèces d'oiseau domestiques est la voie actuellement privilégiée. La mise en culture et l'obtention de ces cellules PGCs en prolifération sont ainsi décrites chez le poulet avec quelques méthodes simples de caractérisations biochimiques. Comme test fonctionnel, l'injection de ces cellules dans des embryons receveurs illustre leur capacité unique à coloniser les gonades et à terme à transmettre leur patrimoine génétique à leur descendance. A plus long terme, le développement de nouvelles méthodes doit être considéré, comme la mise en place de cellules reproductrices à partir de cellules et de tissus somatiques congelés grâce à l'approche prometteuse de reprogrammation somatique.

**ABSTRACT**

**Long-term culture of primordial germ cells (PGC) as a tool for cryopreservation of avian genetic diversity: development, characterization and quality**

Maintaining the genetic diversity of poultry appears to be one of the most important challenges for the coming years. Indeed, there is a requirement to develop efficient and innovative biotechnologies of reproduction in order to maintain a reservoir of genes through the form of frozen germplasm, in addition to the conservation of living animals. Cryobanking of semen, of blastodermal cells and of long term culture primordial germ cells are presently the most promising tools to reach those purposes. In particular, the *in vitro* culture of primordial germ cells (PGCs) in several domestic bird species is presently the method of choice. Obtaining and maintenance of those proliferating PGCs are thus described in the chicken with some simple methods of biochemical characterizations. As a functional test, the injection of these cells into recipient embryos illustrates their unique ability to colonize the gonads and eventually pass on their genetic heritage to their offspring. For long term approaches, the development of new methodologies has to be considered, such as the establishment of reproductive cells from frozen somatic cells and tissues through the promising somatic reprogramming approach.

## INTRODUCTION

La conservation de la variabilité génétique chez les oiseaux domestiques et sauvages est un défi pour la production durable des ressources alimentaires humaines, la gestion des terres et plus largement pour la préservation et le maintien de la biodiversité. L'une des principales sources de variabilité génétique chez les oiseaux domestiques est l'ensemble des races locales, pour la plupart en voie de disparition pour diverses raisons, y compris la restructuration des zones rurales et des pratiques agricoles, les besoins commerciaux et l'exposition aux risques sanitaires et épidémiques (par exemple, la grippe aviaire). Des programmes de conservation existent mais ils font face à une grande hétérogénéité des situations et le maintien des animaux vivants de ces populations à effectifs limités est loin d'être suffisant pour assurer la conservation de leur diversité génétique.

Par conséquent, il est nécessaire de développer de nouveaux outils pour la conservation de la diversité génétique et le maintien de la variabilité génétique dans les lignes commerciales et les races en voie de disparition. Une des raisons les plus importantes de ces développements pourrait être le maintien des allèles rares, comme la résistance à certaines maladies infectieuses ou l'adaptation aux changements environnementaux, qui peuvent manquer dans les lignes commerciales. Un autre intérêt des sélectionneurs pour la conservation génétique est la possibilité de revenir rapidement sur un critère de sélection en cas de changement du marché.

Dans ces conditions, le développement des biotechnologies de la reproduction est un impératif absolu pour fournir et garder des réservoirs de diversité génétique via du matériel génétique congelé. Jusqu'à présent, peu de programmes nationaux ont été mis au point dans ce domaine (Blackburn, 2004; Blesbois et al, 2007). Le projet de Cryobanque aviaire développé en France est celui qui contient le plus grand nombre de génomes stockés avec le statut le plus élevé de sécurité. Il est également le seul programme qui contient les génomes de différentes espèces de volailles (poulet, canard de Barbarie, canard Pékin, jars, pintade, ...). En outre, la méthode mise au point par les partenaires français pour la cryoconservation de sperme est la méthode de référence du programme nord-américain ainsi que la méthode recommandée par la FAO.

Différentes méthodes sont proposées pour faire face à cet objectif ambitieux de maintien de la biodiversité génétique chez les volailles et les espèces aviaires, des méthodes bien maîtrisées comme la cryopréservation du sperme (Blesbois et al, 2007a, 2008), la manipulation de cellules blastodermiques (Pain et al., 1996. Kino et al, 1997) et plus récemment la culture à long terme de cellules germinales primordiales

(PGCs) en prolifération (Van de Lavoie et al., 2006; McDonald et al, 2010; 2012; Park et Han, 2012). Le développement de nouvelles approches, y compris la cryoconservation de cellules somatiques et de tissus pour une utilisation ultérieure via les technologies de reprogrammation somatique doit être considéré dès à présent (Stadtfeld et Hochedlinger, 2010; Takahashi et Yamanaka, 2013). Dans cette optique, une partie de ces biotechnologies de la reproduction est actuellement activement soutenue et développée par le projet français 'Infrastructure d'Avenir' appelé CRB ANIM, projet piloté par M. Tixier-Boichard. Le but de ce projet est de construire un « réseau de centres de ressources biologiques pour les animaux domestiques », y compris les volailles.

L'article présente les éléments de la culture des cellules PGCs et leur caractérisation par des anticorps spécifiques. L'injection de ces cellules marquées par la protéine fluorescente GFP permet de valider au niveau fonctionnel leur contribution à la colonisation des gonades de l'embryon receveur. La maîtrise de la culture de ces cellules permet donc d'obtenir et de maintenir rapidement l'intégralité du génome d'intérêt.

## MATERIEL et METHODES

### Matériel biologique

Les œufs fécondés de *Gallus gallus* de souche JA57 sont incubés à 37°C et 60% d'humidité, avec un basculement de 90° toutes les 60 min.

### Culture de cellules

Les cellules de blastodermes sont prélevées dans des embryons de stade X-XII (Eyal Giladi et Kovak, 1976) et établies en culture pour obtenir des cellules souches embryonnaires (cES) comme décrit précédemment (Aubel et Pain, 2013). Les PGC circulantes sont isolées à partir du sang de 30 embryons incubés pendant 48 - 56 heures, de stade 14-17 HH, à l'aide d'un capillaire étiré (Drummond). 2 à 4 mL de sang sont prélevés dans le système vasculaire d'un embryon. Après lavage au PBS et centrifugation (5 min, 400g, t° ambiante), les cellules sont ensemencées dans deux puits de plaques de 6 puits (Costar) dans 4 mL de milieu ESA modifié (cf infra). Un tiers du milieu est changé tous les deux jours jusqu'à l'émergence d'une population de cellules PGCs homogènes en prolifération active (environ 20 à 30 jours après l'ensemencement). La culture est alors diluée au 1/5 tous les 5 jours en fonction de la croissance des cellules. Toutes les cellules sont cultivées dans un incubateur à CO<sub>2</sub>, maintenu à 39°C dans une atmosphère de 7,5% de CO<sub>2</sub>.

## Milieux de culture

Le milieu ESA de culture utilisé pour l'entretien des cellules souches embryonnaires (cES) est constitué de milieu Dulbelco modifié (DMEM / F12), complété par 10% de sérum foetal bovin (FBS) 1% d'acides aminés non essentiels, 0,16 mM de b-mercaptoéthanol, 1mM de pyruvate de sodium. A ce milieu sont ajoutés 2 ng/mL de facteur inhibiteur de leucémie (LIF), 5 ng/mL de facteur de croissance de l'insuline (IGF-1), 1 ng/mL d'interleukine-6 recombinante humaine (hrIL-6), 1 ng/ml du récepteur soluble à l'Interleukine 6 (hrIL-6s) comme décrit (Aubel et Pain, 2013). Pour les cellules germinales, ce milieu ESA est modifié par l'addition de 10 ng/mL de facteur de croissance pour les fibroblastes basique (b-FGF), de 10 ng/mL de facteur de cellule souche (SCF) et de 2,5% de sérum de poulet décomplémenté 30 min à 56°C. Tous les milieux et produits de culture sont obtenus auprès de Life Invitrogen. Les facteurs et cytokines sont obtenus via R&D Systems ou Peprotech.

## Caractérisation des cellules

Pour la caractérisation des cellules cES et PGCs, les études immunocytochimiques ont été réalisées à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-SSEA-1 (MC-480, au 1/100, DSHB) et de l'anticorps monoclonal anti-CVH dirigé contre les peptides N-terminal (MEEDWDTELEQE) et C-terminal (EWNPREMRMSYSET) réalisé par Biotem comme décrit et testé sur gonade embryonnaire et sur les cellules surexprimant le gène CVH comme précédemment décrit (Lavial et al., 2009). Les cellules fixées au paraformaldéhyde 4% sont incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dans du PBS 1X contenant 0,5% de BSA. Les cellules sont ensuite lavées pendant 30 min dans du PBS 1X et ré-incubées avec des anticorps secondaires pendant une heure (anticorps d'âne anti-IgG de souris Alexa Fluor-543, et de lapin anti-IgM de souris Alexa Fluor 546 pour SSEA-1. Les anticorps secondaires sont achetés auprès du laboratoire Jackson. Les cellules sont ensuite lavées pendant 30 min au PBS 1X, contre-colorées avec une solution de Hoechst (1/1000, Sigma) montées et observées au microscope à fluorescence (Leica CTR 6000). Les images sont prises par caméra (GeneOptic) et traitées par le logiciel Nikon EZ-C 1 Software v3.40.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les cellules cES obtenues à partir des blastodermes de stade X prolifèrent en colonies et amas homogènes (Figure 1A), sont positives pour le marqueur SSEA1, également spécifique des cellules ES des rongeurs (Figure 1B), sont capables d'être modifiées génétiquement et marquées par des rapporteurs fluorescents comme la GFP (Figure 1C). Enfin, elles

participent à la morphogénèse de l'embryon quand elles sont réinjectées dans un embryon receveur de stade X (Figure 1D), selon le protocole détaillé décrit précédemment (Aubel et Pain, 2013). Ces différents critères valident leur nature de cellule souche embryonnaire.

Les changements de milieux, notamment avec l'addition de quantité importante de b-FGF (de 5 à 10 ng/mL) ont permis l'établissement de cellules germinales à partir de différentes origines, dont le sang circulant. Comme illustré, les cellules issues du sang embryonnaire d'un embryon de 2 jours d'incubation sont un mélange d'hématies et de quelques cellules germinales (Figure 2A). Après quelques jours en culture dans le milieu adéquat (cf supra), les cellules PGCs émergent et prolifèrent de façon homogène (Figure 2B). Les PGC cultivées à long terme peuvent donc être considérées comme l'un des outils les plus prometteurs pour la constitution de cryobanques, notamment par l'amélioration des conditions de cultures (Choi et al, 2010; McDonald et al, 2010). Depuis les premières expériences réalisées chez le poulet, plusieurs rapports indiquent que ces cellules peuvent être également isolées, cultivées et gérées dans différentes espèces aviaires, ce qui renforce leur intérêt pour la gestion de la biodiversité génétique (Nakamura et al., 2013).

Les PGC cultivées peuvent être issues de différentes origines, principalement à partir de la circulation sanguine embryonnaire (Figure 2A), mais également à partir de cellules blastodermiques ou gonades embryonnaires (Song et al, 2014). Ces cellules expriment plusieurs marqueurs associés à la pluripotence comme les gènes cPOUV / OCT4 et NANOG (Bachelard et al., 2015; Lavial et al., 2007) ainsi que les épitopes reconnus par l'anticorps SSEA1 (Figure 2C), par les anticorps EMA1, CECAM et  $\beta$ 1-INTEGRIN. Les cellules cultivées expriment également plusieurs gènes spécifiques germinaux, tels que DAZL, DN1 et CVH et de nouveaux gènes récemment identifiés par une étude transcriptomique comparative comme les gènes GPR149, FEZF2 et PIWIL (Jean et al., 2015). Ces différents marqueurs aident à définir la qualité des PGC maintenues en culture.

L'une des propriétés les plus importantes de ces PGC en culture à long terme est leur capacité à contribuer efficacement à la lignée germinale. Même modifiées par un vecteur permettant l'expression ubiquitaire de la GFP (Figure 2D), les PGCs sont encore capables de coloniser les gonades (Figure 2E). Ainsi, la maîtrise de la modification génétique de ces cellules en fait également un outil important pour une utilisation en biotechnologie comme la génération d'animaux porteurs de gènes de résistance à des pathologies (Park et Han, 2012; McDonald et al, 2012).

## CONCLUSION

Le développement et l'utilisation des biotechnologies de la reproduction chez les espèces aviaires sont actuellement une voie prometteuse pour maintenir la diversité génétique chez les volailles et probablement aussi dans un proche avenir chez les oiseaux sauvages. Parmi les différentes technologies bien connues et maîtrisées la culture *in vitro* à long terme des cellules PGCs apparaît comme la plus prometteuse pour la volaille et les espèces menacées. Cette technologie devrait faire rapidement son apparition dans la stratégie de cryoconservation des souches et lignées d'intérêt, notamment par la facilité de récupérer l'ensemble des gènes de la lignée en une seule génération. Cependant, pour certains génotypes

rares, le développement et la maîtrise de la reprogrammation somatique sont également considérées comme un outil prometteur qui ne nécessite pas la destruction de l'animal ou de l'embryon, mais seulement une biopsie. Mais ces approches sont encore à l'état de développement et sont moins maîtrisées que la culture des PGCs.

## REMERCIEMENTS

Ce travail est soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche, Cryobird (ANR-09-IBLAN) et Investissement d'Avenir, CRB-Anim (ANR-11-INBS-0003) à BP

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aubel P, Pain B. 2013. *Methods Mol Biol.* (1074), 137-50.
2. Bachelard E., Raucchi F., Montillet G., Pain B. 2015. *Theriogenology* (83), 377-84.
3. Blackburn HD. 2004. *Reprod Fertil Dev.* (16), 27-32.
4. Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, Mialon-Richard MM. 2008. *Theriogenology.* (69), 252-61.
5. Blesbois E, Seigneurin F, Grasseau I, Limouzin C, Besnard J, Gourichon D, Coquerelle G, Rault P, Tixier-- Boichard M. 2007. *Poult Sci.* (86), 555-64.
6. Choi JW, Kim S, Kim TM, Kim YM, Seo HW, Park TS, Jeong JW, Song G, Han JY. 2010. *PLoS One.* (5), e12968.
7. Eyal-Giladi H, Kochav S. 1976. *Dev Biol.* (49), 321-37.
8. Hamburger V, Hamilton HL. 1951. *J. Morphol.* (88), 49-92.
9. Jean C, Aubel P, Soleihavoup C, Bouhallier F, Voisin S, Laval F, Pain B. 2013. *Dev Growth Differ.* (55), 41-51.
10. Jean C., De Oliveira NM, Intarapat S, Fuet A, Mazoyer C, De Almeida I, Trevers K, Boast S, Aubel P, Bertocchini, Stern C, Pain B. (2015). *Stem Cell Res.*(14), 54-67.
11. Kino K, Pain B, Leibo SP, Cochran M, Clark ME, Etches RJ. 1997. *Poult Sci.* (76), 753-60.
12. Laval F, Acloque H, Bachelard E, Nieto MA, Samarut J, Pain B. 200). *Dev Biol.* (330), 73-82.
13. Laval F, Acloque H, Bertocchini F, Macleod DJ, Boast S, Bachelard E, Montillet G, Thenot S, Sang HM, Stern CD, Samarut J, Pain B. 2007. *Development* (134), 3549-63.
14. Macdonald J, Glover JD, Taylor L, Sang HM, McGrew MJ. 2010. *PLoS One.* (5), e15518.
15. Macdonald J, Taylor L, Sherman A, Kawakami K, Takahashi Y, Sang HM, McGrew MJ. 2012. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (109), 1466-72.
16. Nakamura Y, Kagami H, Tagami T. 2013. *Dev Growth Differ.* (55), 20-40
17. Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches RJ. 1996. *Development.* (122), 2339-48.
18. Park TS, Han JY. (2012). *Ann N Y Acad Sci.* 1271: 104-9.
19. Song Y1, Duraisamy S, Ali J, Kizhakkayil J, Jacob VD, Mohammed MA, Eltigani MA, Amisetty S, Shukla MK, Etches RJ, de Lavoie MC. (2014). *Biol Reprod.* 90: 15.
20. Stadtfeld M, Hochedlinger K. 2010. *Genes Dev.* (24), 2239-63.
21. Takahashi K1, Yamanaka S. 2013. *Development.* (140), 2457-61.
22. van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, Delany ME, Etches RJ. (2006a). *Nature* 441: 766-9.

**Figure 1 : Cellules souches embryonnaires de poulet**

Les cellules souches embryonnaires de poulet prolifèrent en amas homogènes (A), sont reconnus par l'anticorps SSEA-1 (B), anticorps spécifiques des cellules ES, peuvent être modifiées génétiquement pour exprimer la 'green fluorescent protein (GFP) (C) et participent à la morphogénèse quand elles sont réinjectées dans un embryon receveur (D) (les somites sont marqués par un \*).

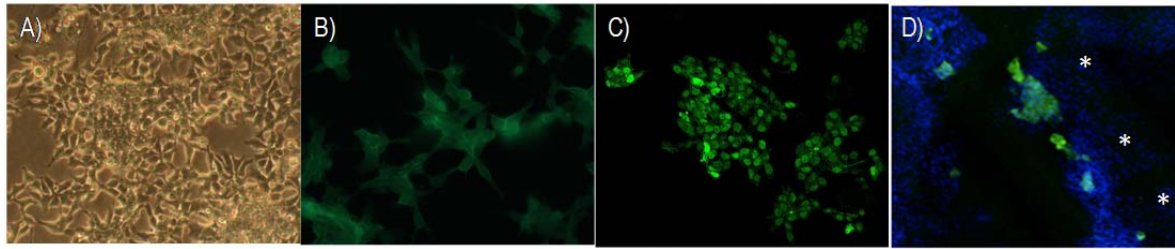


**Figure 2 : Cellules primordiales germinales**

Les cellules primordiales germinales (PGCs) sont obtenues à partir du sang embryonnaire (A – d'après Rauci et al. soumis). Après leur mise en culture, elles prolifèrent de façon homogène en suspension (B), sont positives pour l'anticorps SSEA-1 (C), comme les cellules souches embryonnaires, mais sont également positives pour le marqueur germlinal spécifique VASA (DDX4 (D)).

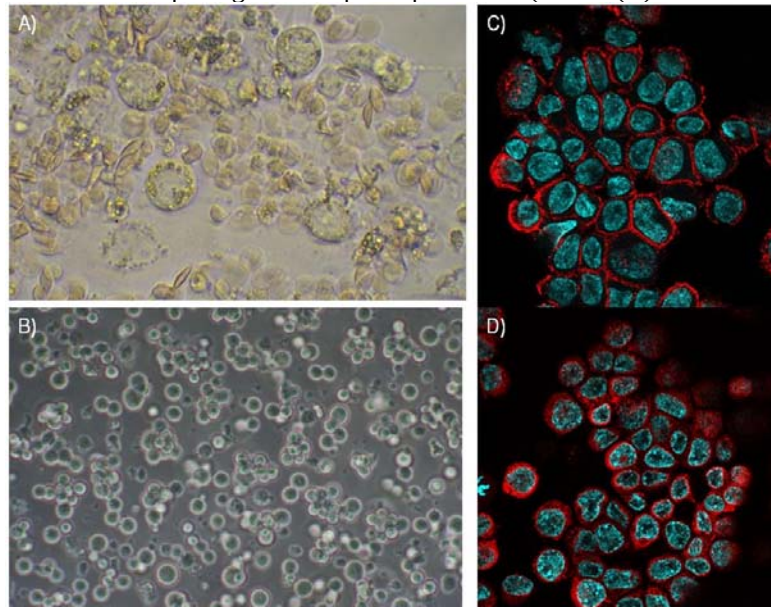


**Figure 3 : Cellules PGC dans les gonades d'un embryon receveur**

Les cellules PGCs maintenues en culture peuvent être marquées par un gène rapporteur fluorescence (A) et sont capables de coloniser les gonades d'un embryon receveur quand elles sont réinjectées (B). Cette capacité de colonisation est leur atout principal comme support de matériel génétique à cryoconserver.

