

**DEVELOPPEMENT DES TECHNIQUES DE GREFFES DE CELLULES
SOUCHES GERMINALES AU SERVICE DES PRODUCTIONS PISCICOLES :
LA REALITE REJOINT-ELLE LA SCIENCE FICTION ?**

FNPF – Laurent Madelon

Anne-Sophie GOUPIL, Sarah TREMPONT , et Jean-Jacques LAREYRE

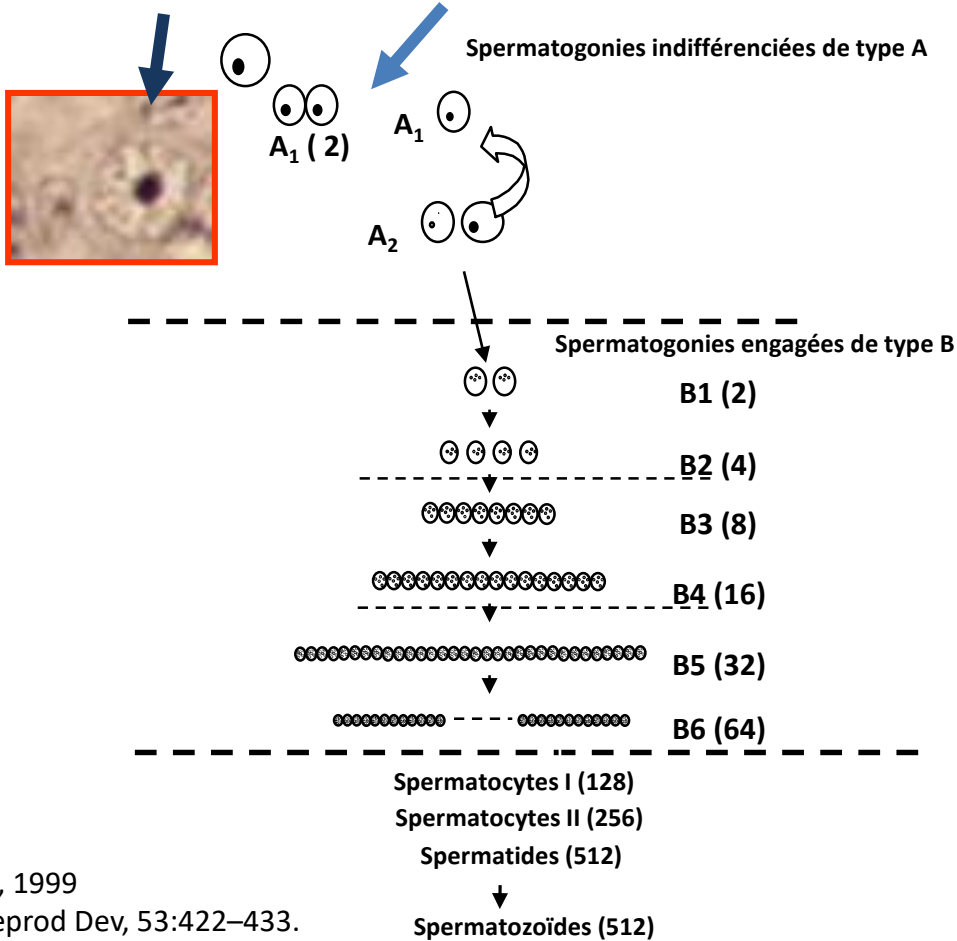


Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons
Bâtiment 16, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex
Contact: jean-jacques.lareyre@inra.fr

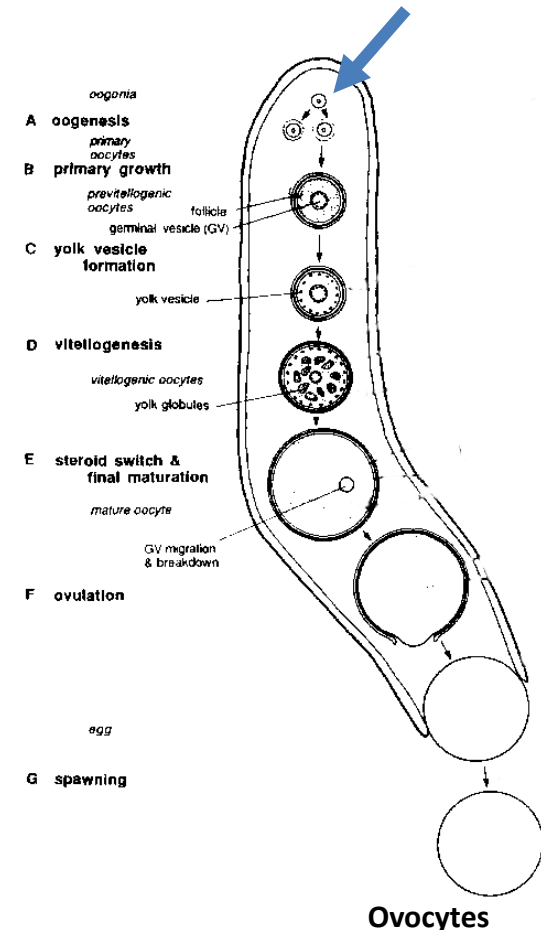
Fonction des cellules souches germinales adultes



SSC: cellules souches spermatogoniales



OSC: cellules souches ovogoniales



Loir M, 1999
Mol Reprod Dev, 53:422–433.

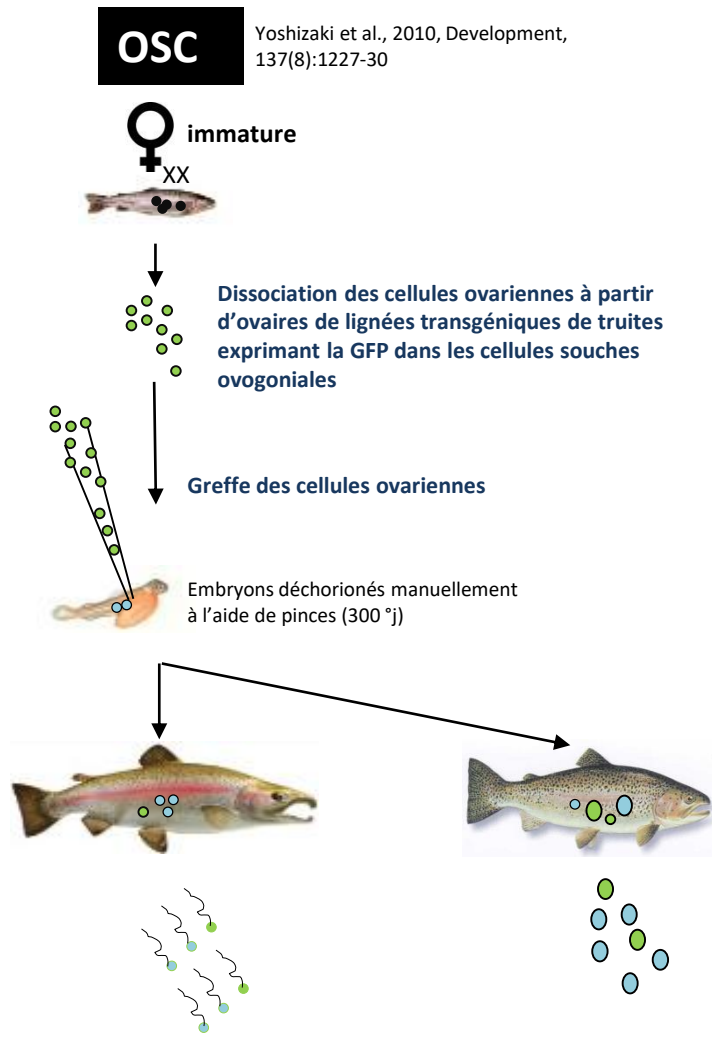
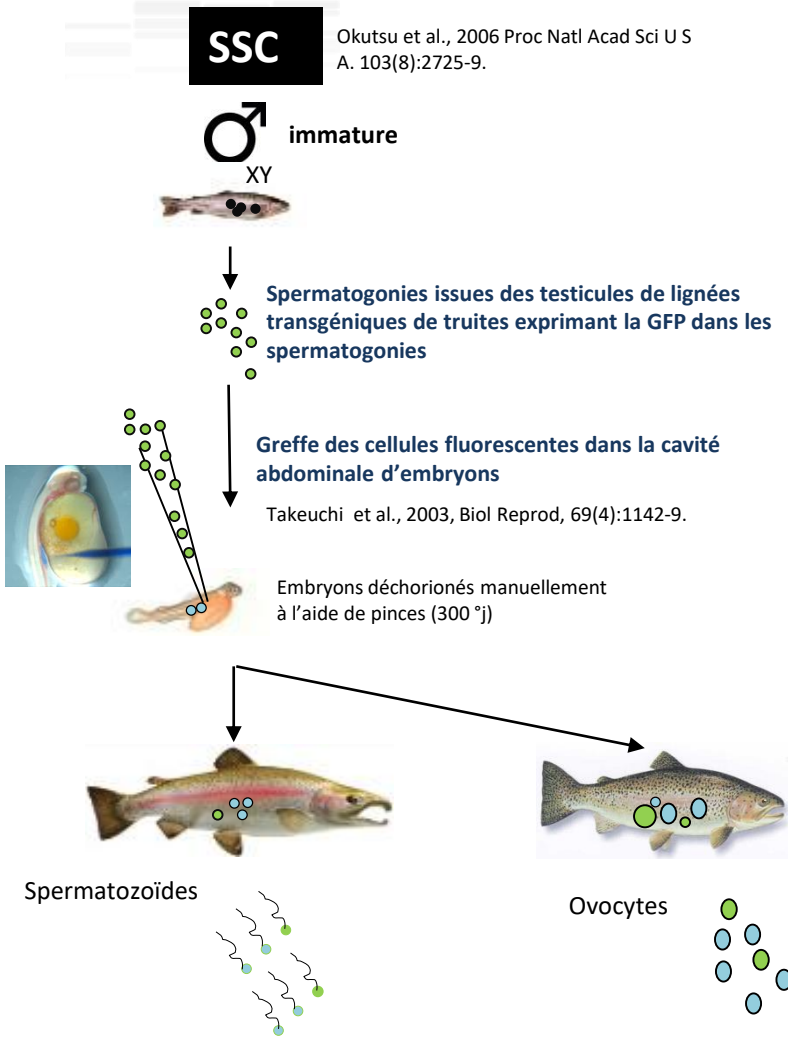


Goro Yoshizaki

Les cellules souches germinales adultes des poissons sont bipotentes

Donneur

Receveur





Développements des techniques de greffes

Grefe applicable à de nombreuses espèces

- Salmonidés (truites, saumons...): Takeuchi et al., 2003 Biol Reprod, 69(4):1142-9; Bellaiche et al, 2014, Biol Reprod, 90(4):79
- Perciformes (Nibe croaker: Takeuchi et al., 2009, Biol Reprod, 81(6):1055-63. ; Maquereau: Yazawa et al., 2013, Mol Reprod Dev, 80(10):871-80).
- Cichlidés (tilapia): Lacerda et al., 2010 PLoS One. 5(5):e10740; Farlora et al., Mar Biotechnol, 16(3):309-20.
- Cyprinidés (carpes, poisson zèbre...): Wong et al., 2011, Biol Reprod, 84(6):1190.
- Acipenseriformes (Esturgeon): Psenicka et al., 2015, Theriogenology, 83(6):1085-92).

Grefe de receveurs stériles

- triploïdes (Okutsu et al., 2007, Sciences, 317(5844):1517)
- hybrides (Wong et al., 2011, 84(6):1190)
- morpholinos anti-Dead End (Yoshizaki et al., 2016, Mol Reprod Dev 83:293-311)

Grefe inter-spécifiques (d'une espèce à l'autre) est possible

- GSC de truite TAC → saumon masu (Okutsu et al., 2007, Science. 2007)
- GSC du Jundia catfish (Rhamdia quelen) → tilapia du nile (Silva et al., 2016, Gen Comp Endocr, 230–231, 48–56)

Cryopréserver les cellules souches germinales adultes

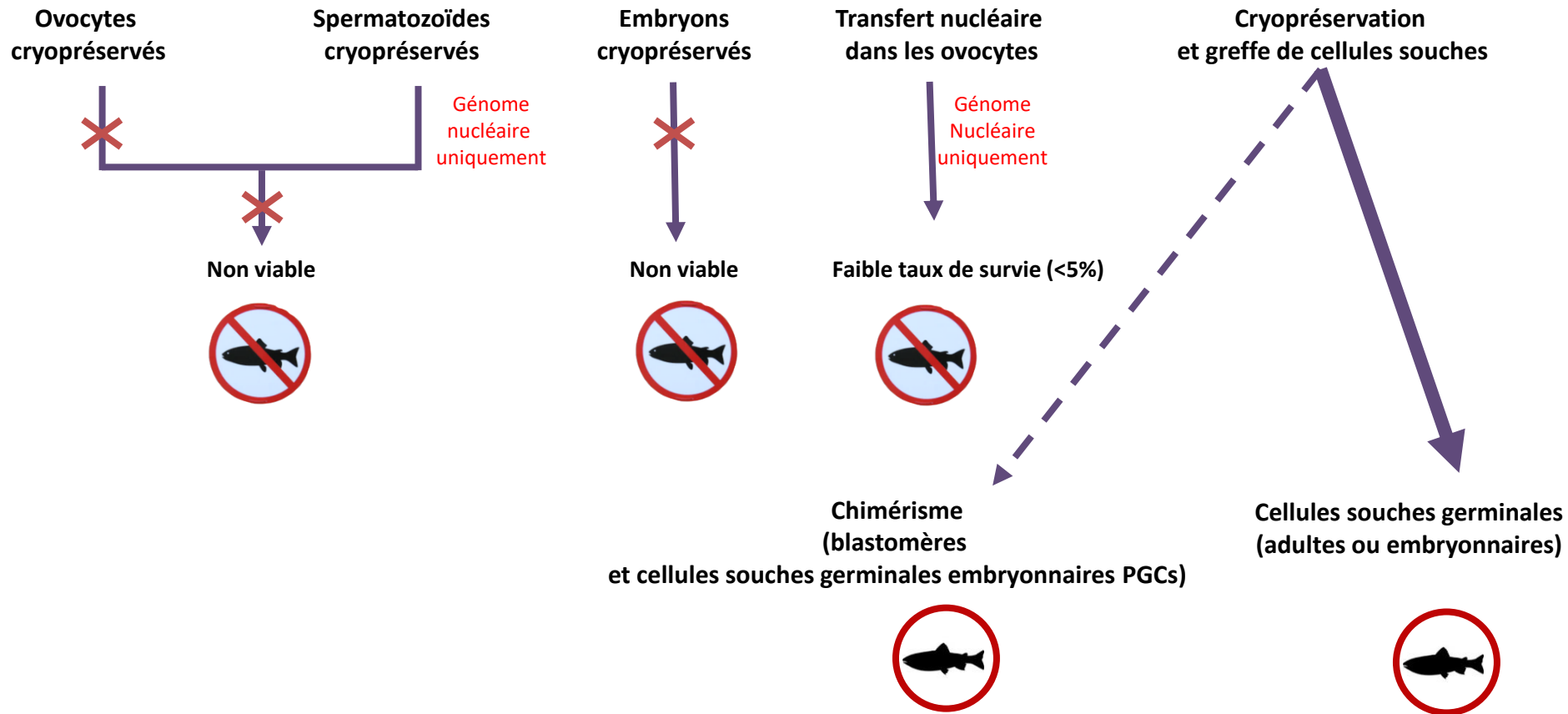
- fractions cellulaires enrichies en cellules souches germinales (Takeuchi et al., 2003 Biol Reprod, 69(4):1142-9)
- fragments de gonades (Lee et al., 2013 Proc Natl Acad Sci U S A., 110(5):1640-5; Lee et al, 2016, Biochem Biophys Res Commun, 478(3):1478-83; Lujic et al., 2017, Cryobiology, 76:154-157)
- poissons entiers congelés (Lee et al., 2015, Sci Rep, 5:16045)



Objectifs de nos études en cours :

- Optimiser et simplifier la procédure de greffe pour la rendre applicable dans les piscicultures d'expérimentation animale et dans les piscicultures commerciales**
- Développer de nouvelles applications pour les productions piscicoles**

Conservation et régénération des ressources génétiques générées dans les infrastructures de recherche ou les piscicultures commerciales



Régénération de lignées de truite (monosexe femelle) importantes pour les recherches à l'INRA

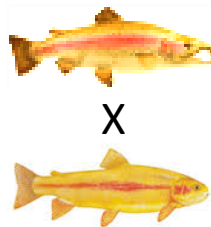
Souche à préserver (donneur)



Souche receveuse (porte-greffe)



Population bisexuée de la souche « golden »



Mâles génétiques
ou néomales



Élutration
centrifuge

Cellules testiculaires totales
ou
Cellules souches germinales
préalablement purifiées ?

Embryons éclos (320 °J)

1 - 2 ans

2 - 3 ans

Male greffé

Femelle greffée

spermatozoïdes

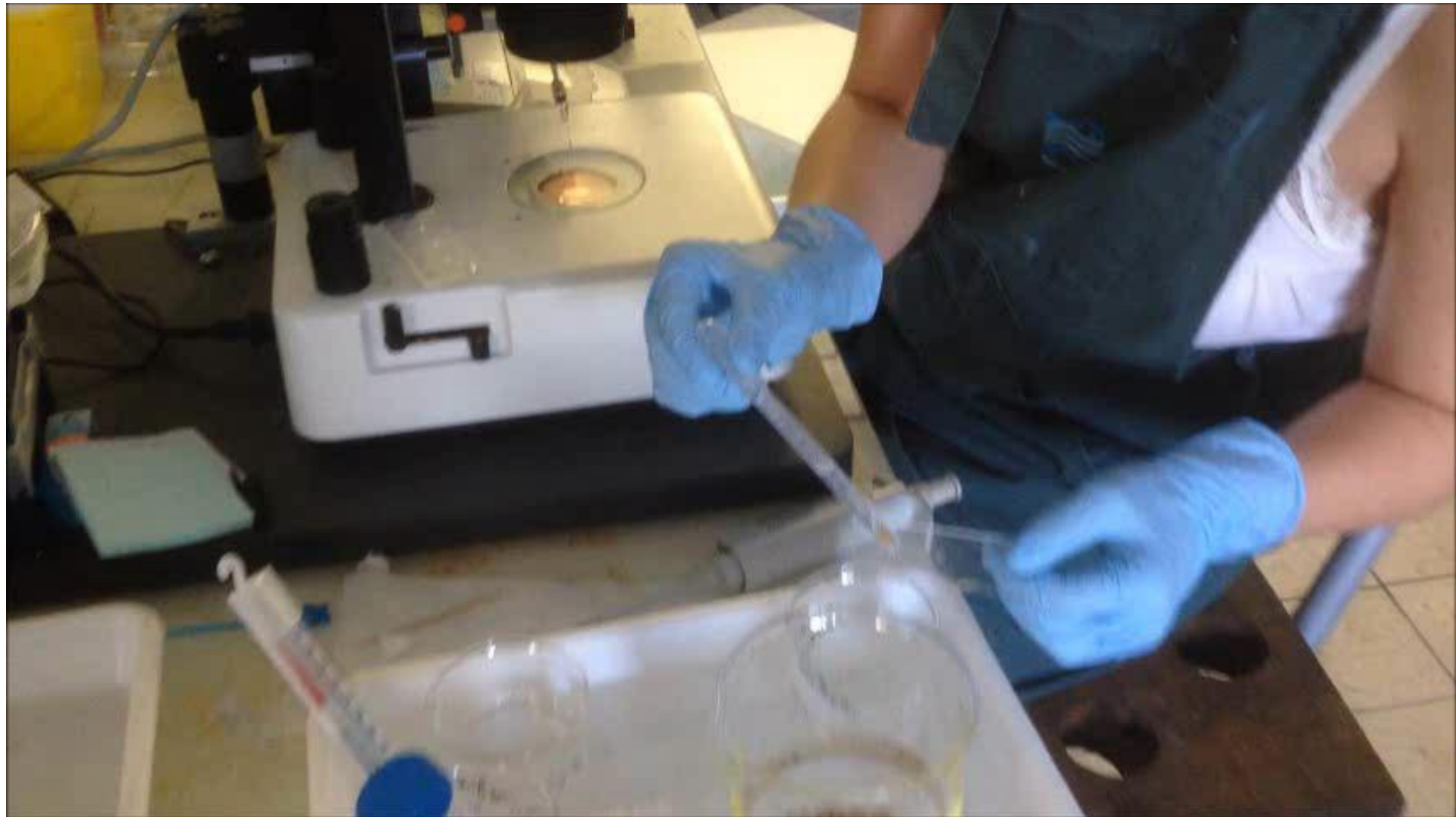
ovocytes

Individus régénérés

Introduction d'un indicateur
coloré dans la suspension
cellulaire

Embryons receveurs triploïdes

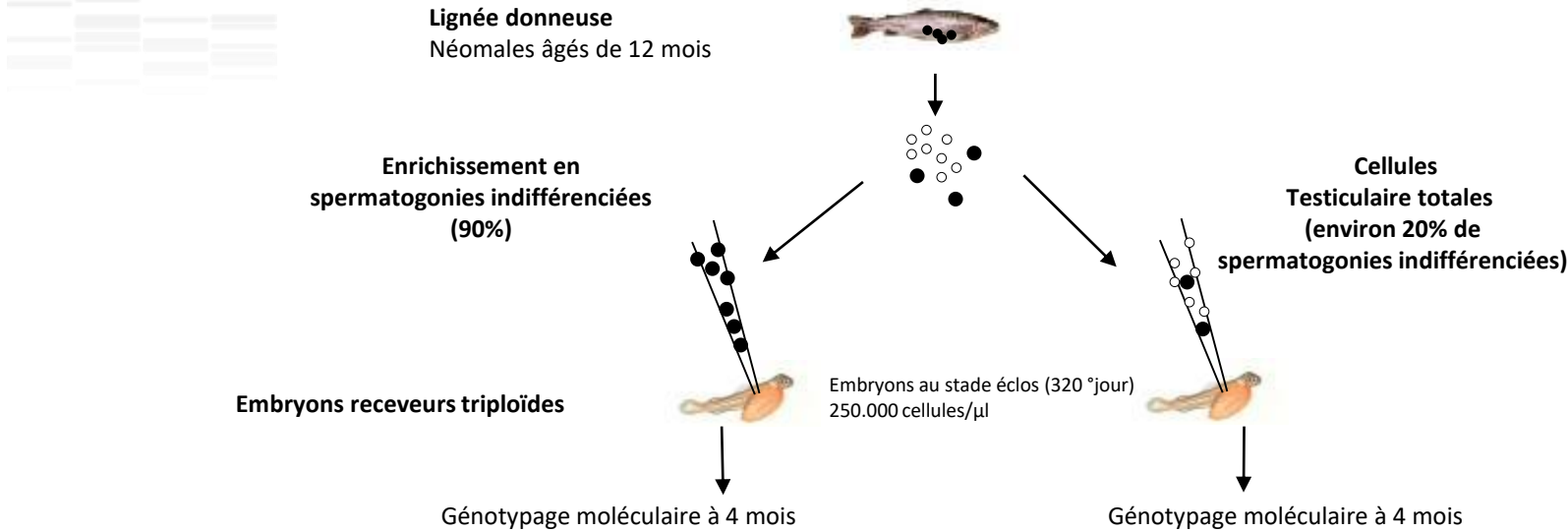
Performances des
receveurs greffés ?



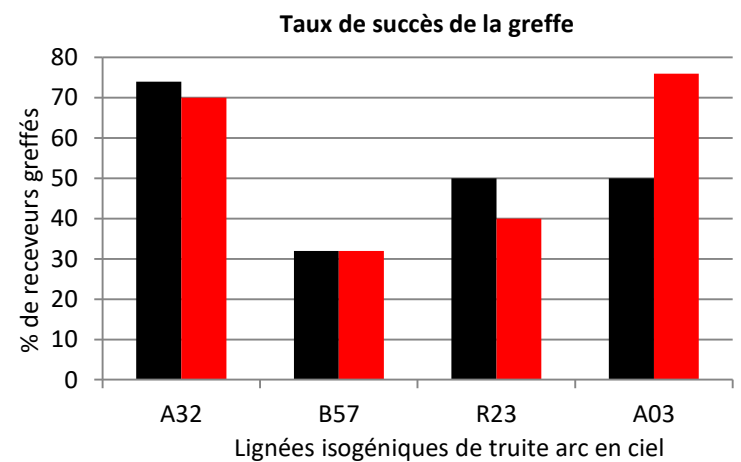
Dispositif mis en place au laboratoire et dans les piscicultures pilotes



Est-il nécessaire de purifier les cellules souches spermatogoniales ?



■ Enrichissement en spermatogonies indifférenciées
■ Cellules testiculaires totales





Performances de reproduction des femelles triploïdes greffées

La période de ponte correspond à celle de la souche receveuse.

Malgré une colonisation parfois unilatérale de l'un des deux ovaires, **80% des femelles greffées** produisent un nombre d'œufs similaire à celui de la lignée receveuse (1500 à 2000 œufs/kg) dès la deuxième année.

La qualité des œufs des femelles greffées est variable mais similaire à celle observée avec les femelles diploïdes de la souche receveuse.

Tous les descendants sont génétiquement conformes à la lignée donneuse de cellules souches spermatogoniales.

Performances de reproduction des mâles triploïdes greffés

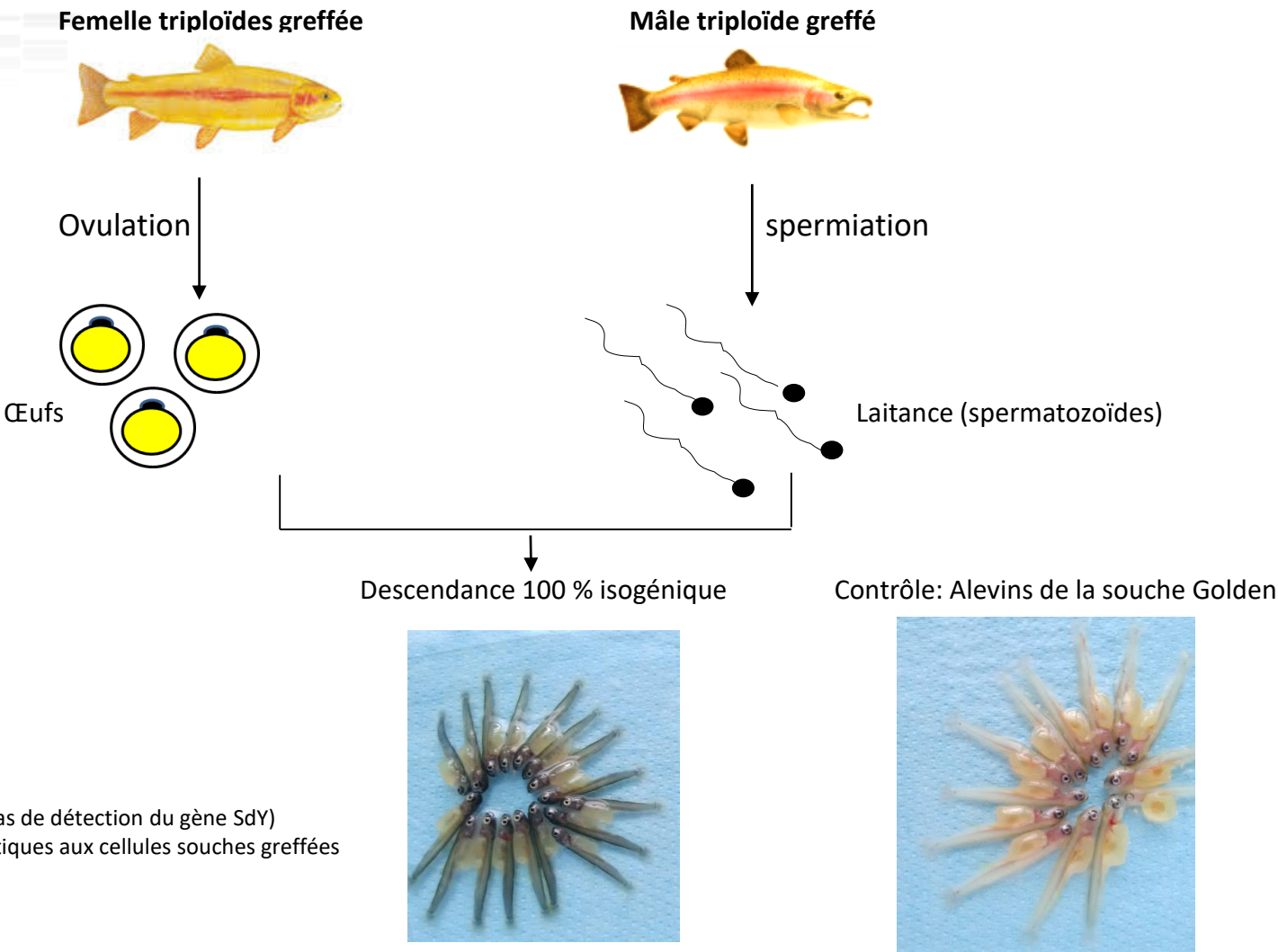
La période de spermiation correspond à celle de la souche receveuse.

Colonisation unilatérale ou bilatérale des testicules

Seuls 10 à 50% des mâles greffés produisent plus de 1 ml de laitance avec une concentration supérieure à 10^8 spermatozoïdes / ml

La qualité de la laitance est normale.

Régénération de descendants génétiquement conformes aux cellules souches spermatogoniales greffées



- Tous les descendants sont femelles (pas de détection du gène SdY)
- Au moins deux variants alléliques identiques aux cellules souches greffées



Applications des greffes de cellules souches germinales adultes dans le domaine des productions piscicoles

Conservation et régénération des ressources génétiques

- Espèces ou lignées sélectionnées d'intérêt agronomique
- filière de repeuplement des espèces en danger



Coord: M. Tixier-Boichard



Coord: M. Vandeputte

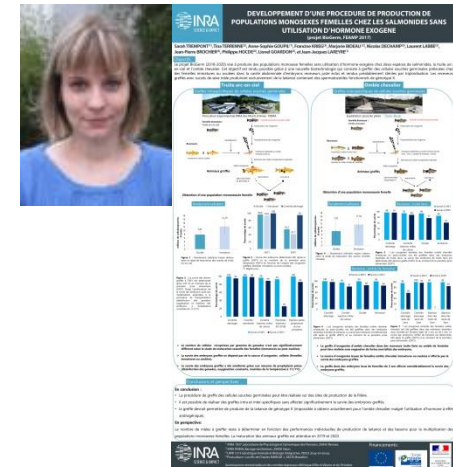


Production de populations monosexes sans hormone exogène

- Salmonidés
- Turbot
- Esturgeons



Coord: JJ Lareyre



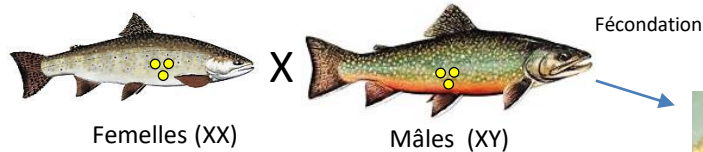
Accélération ou multiplication des cycles de production saisonnier des gamètes notamment pour les espèces à puberté tardive et/ou de grande taille

- Esturgeons
- Thon

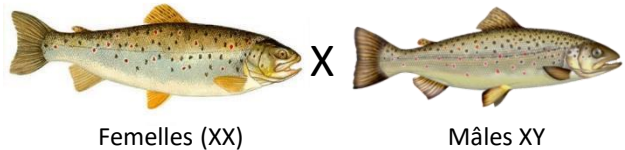
Production de populations monosexes femelles chez l'Ombre chevalier sans hormone exogène

Receveurs:

Saumon de fontaine



Truite fario



Donneurs:



Femelle Ombre chevalier

- juvéniles 15-20 mois
- post-ovulées à 25 mois

préparation de cellules ovariennes totales

transplantation

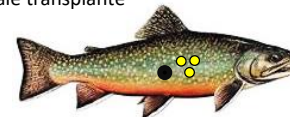
triploïdisation

410°J

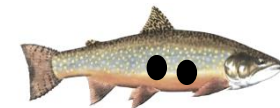
Embryons triploïdes au stade éclosion

Male transplanté

Porte-greffes triploïdes

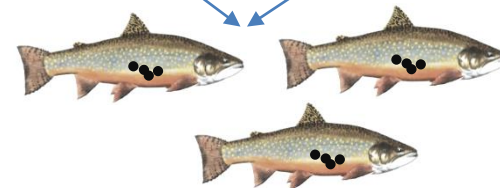


Spermatozoïdes
de génotype X



Ovocytes X ●

Population monosexuée femelle d'ombles chevaliers





Conclusions et perspectives

Conclusions :

La technique de greffes de cellules souches germinales est désormais applicable sur le terrain.

La greffe des cellules souches spermatogoniales est très efficace pour régénérer des œufs et satisfaisante pour produire de la laitance.

La greffe d'ovogonies souches est en cours d'évaluation.

Perspectives:

Développer une procédure de cryopréservation des cellules souches germinales à haut débit et applicable sur le terrain (vitrification de fragments gonadiques)

Développer l'enrichissement ou l'amplification des cellules souches germinales extraites des ovaires de femelles juvéniles et/ou ovulées ?

REMERCIEMENTS

INRA (LPGP, Rennes)



Florence
Le Gac



Anne-Sophie
Goupil



Sarah
Trempont



Ahmed
Maouche



Cécile
Duret

Cryopréservation



Catherine
Labbé



Alexandra
Depincé



Stéphanie
Kica

INRA (PEIMA, barrage du Drennec, Sizun)



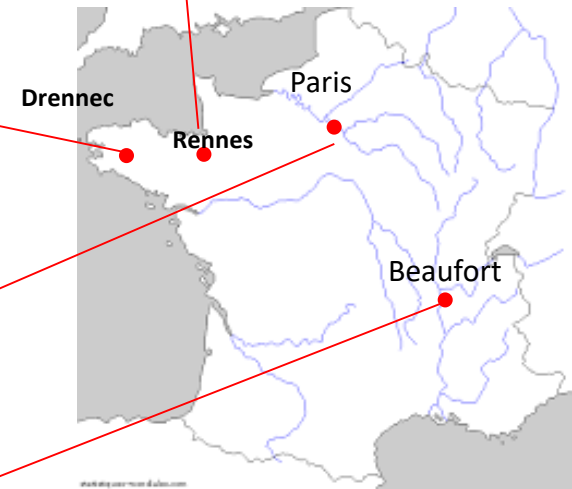
Lionel
Goardon



Marjorie
Bideau



Tina
Terrenne



INRA (GABI, équipe GenAqua, Jouy-en-Josas)

Francine Krieg
Edwige Quillet
Nicolas Dechamp

Charles Murgat
Pisciculteur de Père en Fils depuis 1898

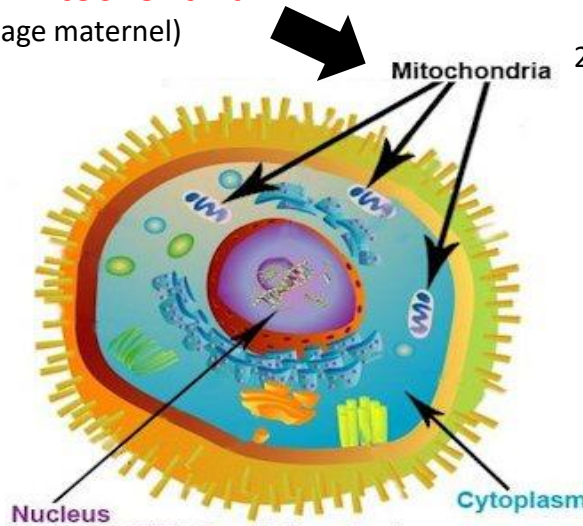
Jean-Pierre Brochier, Philippe Hocdé, Roman Murgat, Vincent Murgat

Les interactions entre les génomes nucléaire et mitochondrial influencent de nombreux caractères phénotypiques

Génome Mitochondrial
(héritage maternel)

37 gènes (13 protéines, 22 ARNt, et 2 ARNr)

2 régions non codantes



Génome nucléaire
(héritage paternel et maternel)

Satoh et al., 2016, BMC Genomics, 17(1): 719.

Rôle du génome mitochondrial:

- **Traits métaboliques** (consommation d'oxygène, stockage d'énergie, réponse cellulaire au stress)

Wang et al., 2017 Sci Rep 7: 4179.

- **Traits comportementaux** (plasticité neuronale, comportements sociaux, mémoire spatiale)

Mattson et al., 2008 Neuron, 60(5): 748–766.