

INRAE

l'Europe
s'engage
en France
avec le FEAMP

AQUA
EXCEL
2020



RÉPUBLIQUE
FRANÇAISE

Liberté
Égalité
Fraternité



AQUA
EXCEL
3.0
AQUAculture infrastructures
for EXCELlence in European
fish research 3.0

LA CRYOCONSERVATION DES CELLULES GERMINALES SOUCHES CHEZ LA TRUITE ARC EN CIEL :

... une stratégie pour restaurer l'intégralité d'un
génotype d'intérêt.

Catherine Labbé et al. (Goupil, Goardon, Lareyre, Terenne ...)
Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons (LPGP), RENNES



JRFP
JOURNÉES DE LA
RECHERCHE FILIÈRE
PISCICOLE

07/2022

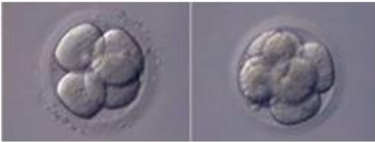
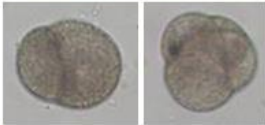
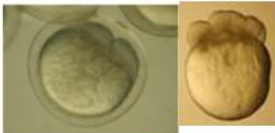
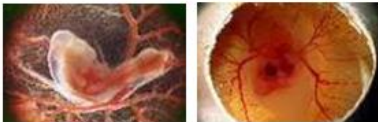
Le spermatozoïde = principale ressource en cryoconservatoire



- **Type cellulaire facilement accessible chez les espèces domestiquées**
- **Régénération possible par fécondation ;**
- **Mais :** Restauration de seulement 50 % du génotypes d'intérêt si des femelles de la même lignée ne sont pas accessibles au moment de la régénération

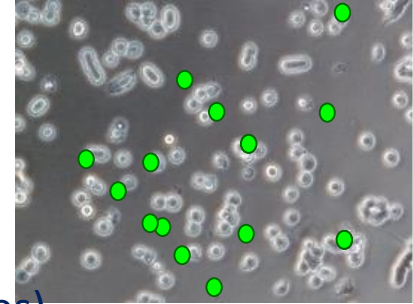
Les ovules et embryons de poisson ne se congèlent pas ...

Pourquoi ne peut on congeler les ovules/embryons de poisson ?

Espèce	Segmentation	Taille de l'œuf	Cong. ?
Mammifères		100-150µm	YES
Bovin 4C-8C			
Huître		30µm	YES
2C-4C			
Poisson rouge		1 mm	NO
2C-8C			
Truite		0,5 cm	NO
2C-5J			
Poule		3,5 cm	NO
2J-6J			

Tirer profit de la plasticité des cellules germinales souches

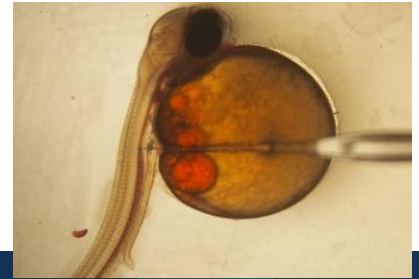
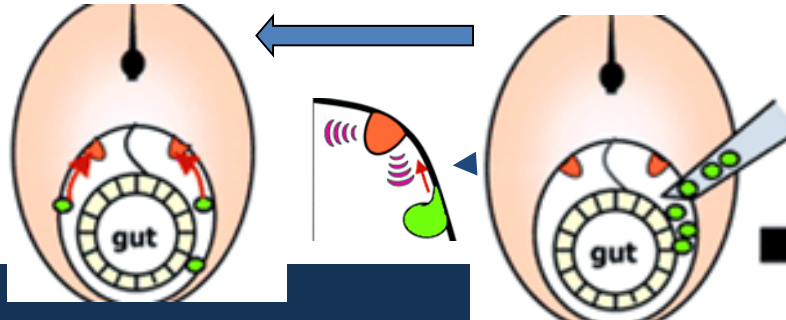
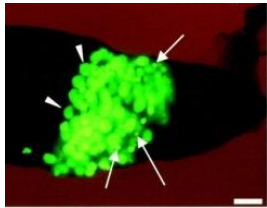
... pour obtenir des ovules



Abondantes dans les testicules immatures (>> ovaires)

Capacité à se différencier en ovules ou en spermatozoïdes (bipotentes)

Les ovules produits contiennent en sus le génome mitochondrial de la lignée d'intérêt

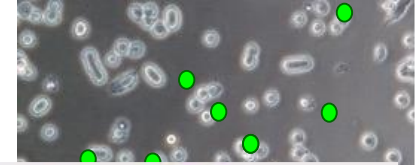
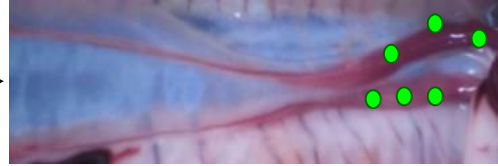


Régénération d'ovules

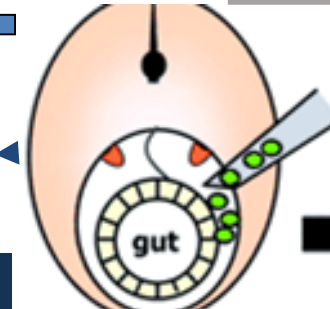
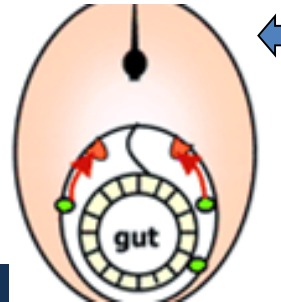
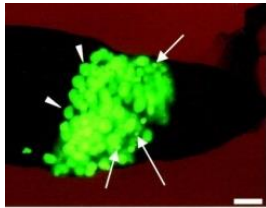
Greffes

Tirer profit de la plasticité des cellules germinales souches

... pour obtenir des ovules



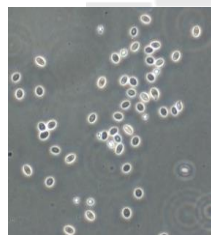
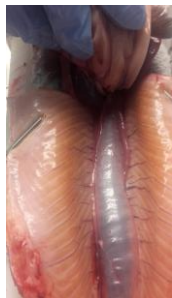
Ajouter l'étape de cryoconservation à une procédure de régénération validée = revient à cryoconserver des ovules en devenir



Régénération

Grafting

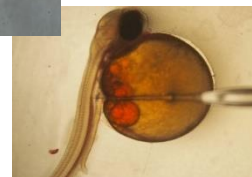
Cryoconservation des cellules germinales souches isolées



Suspension de cellules testiculaires contenant les cellules souches



(50-85 %)



(80-90 % %)

Obtention de receveurs positifs à des taux identiques aux frais

Cryoprotectant	Additives	Container	Cryopreservation system
DMSO	Sucrose	Cryotubes	Raft <u>above</u> LN2
Propane Diol	Egg Yolk	<u>Straws</u> 500 µL	LN2 (« vitrification »)
	Stem Alpha™	<u>Straws</u> 250 µL	Freezer -80°C + freeze box / « poupées »
	PVP		Programmable freezer
	FBS		

Mise en pratique pour les ressources piscicoles



Mise en pratique exigeante :

- Dissociation cellulaire des testicules
- Congélateur programmable (congélation lente)

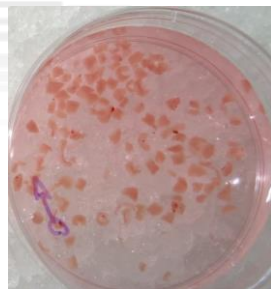
Exploration d'autres pratiques

- Congélation de fragments testiculaires
- Congélation directe dans l'azote liquide (vitrification)
- Validation en pisciculture expérimentale INRAE PEIMA

Cryoconservation de fragments testiculaires



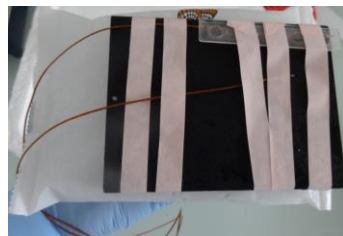
Testicules entiers
(immatures, contenant les cellules souches)



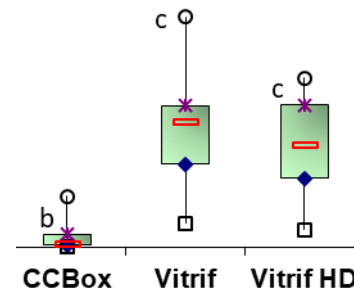
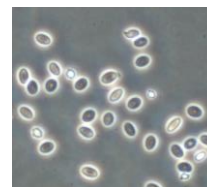
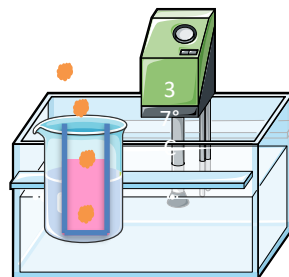
Coupure en fragments



Bains de cryoprotecteurs de concentrations croissantes = compromis cryoprotection / toxicité

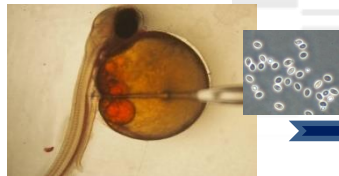


Plongoir 4°C ----- Azote liquide (-196 °C) ----
paillettes de stockage



Décongélation ----- Dissociation ----- Récupération 10-40 %

Régénération des ovules à partir de testicules cryoconservés

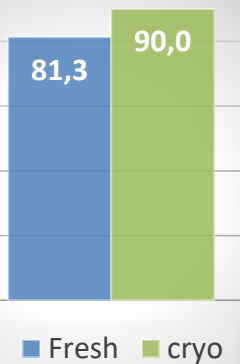


Greffe de receveurs
stériles au stade
éclosion



Collecte des ovules
des femelles à 2 ans

% femelles receveuses...



Pas d'effet délétère de
la cryoconservation

ET ... Fécondance des ovules Cryo = Frais

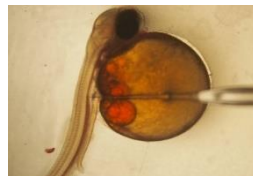
En résumé ...



10 mâles (9 mois)
= 1,2 g testicules



Congélation et stockage



Greffe de 180 alevins
femelles (1/2 jour)



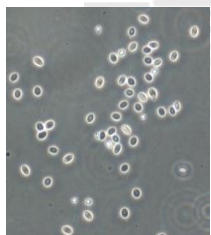
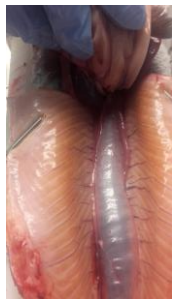
Récupération de 65 femelles avec
ovules fonctionnels
(40 % survivies x 90 % colonisées)

➡ Ovules issus de fragments testiculaires x spermatozoïde cryoconservés de la même lignée = 100 % du génotype (nucléaire et mitochondrial)

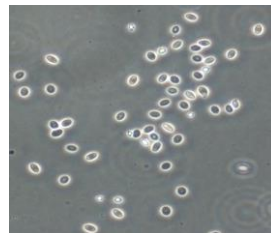
➡ Application aux lignées INRAE en November 2022



Cryoconservation des cellules germinales souches isolées



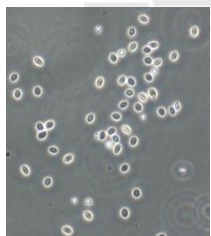
Suspension de cellules testiculaires contenant les cellules souches



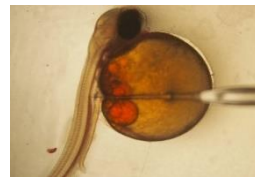
Récupération de 50-83 % des cellules testiculaires (incluant les cellules souches)

Cryoprotectant	Additives	Container	Cryopreservation system
DMSO	Sucrose	Cryotubes	Raft <u>above</u> LN2
Propane Diol	Egg Yolk	<u>Straws</u> 500 µL	LN2 («vitrification»)
	Stem Alpha™	<u>Straws</u> 250 µL	Freezer -80°C + freeze box / « poupées »
	PVP		Programmable freezer
	FBS		

Cryoconservation des cellules germinales souches isolées



Suspension de cellules testiculaires contenant les cellules souches



Greffe dans des alevins femelle stériles

80-90 % des alevins greffés produisent des ovocytes (↔ Frais)



Cryoprotectant	Additives	Container	Cryopreservation system
DMSO	Sucrose	Cryotubes	Raft above LN2
Propane Diol	Egg Yolk	Straws 500 µL	LN2 («vitrification»)
	Stem Alpha™	Straws 250 µL	Freezer -80°C + freeze box / « poupées »
	PVP		Programmable freezer
	FBS		