

La cryoconservation des cellules germinales souches chez la truite arc-en-ciel : une stratégie pour restaurer l'intégralité d'un génotype d'intérêt

Anne-Sophie GOUPIL¹
Stéphanie KICA¹
Tina TERRENNE²
Lionel GOARDON²
Alexandra DEPINCÉ¹
Charlène LABESSE¹
Jean-Jacques LAREYRE¹
Catherine LABBÉ¹

CORRESPONDANCE

catherine.labbe@inrae.fr

jean-jacques.lareyre@inrae.fr

RÉSUMÉ

La conservation en cryobanque des ressources génétiques chez les poissons repose uniquement sur la cryoconservation du sperme, puisque la cryoconservation des ovules et des embryons chez ces espèces à œufs téolécithes est toujours impossible. Pour autant, la cryoconservation des cellules germinales souches est envisageable. On sait, par ailleurs, que des cellules germinales souches injectées dans la cavité abdominale d'alevins receveurs intégraient leurs gonades et conduisaient in fine à la production de gamètes fonctionnels. Dans le cadre de la mise en place de l'infrastructure CRB Anim, pilier animal de RARe, une méthode de cryoconservation des cellules germinales souches a été mise au point chez la truite arc-en-ciel. Nous présentons et commentons ici la méthode retenue : le recours aux protéines d'origine animale dans le dilueur a été évité, la qualité des cellules décongelées a été validée et leur capacité à coloniser les gonades d'alevins receveurs a été démontrée. La stratégie de cryoconservation décrite permet l'entrée en cryobanque d'un matériel biologique qui assure la restauration de l'intégralité d'un génotype d'intérêt après cryoconservation chez les poissons.

MOTS-CLÉS

Cryobanque, ressources génétiques, *Oncorhynchus mykiss*, poissons.

1 INRAE, Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons LPGP, UR1037, 35 000 Rennes.

2 INRAE, UE PEIMA, 29450 Sizun.

Ce travail a été initié et encouragé par Florence Le Gac, décédée le 9 juillet 2018 alors que les premiers succès de greffe après cryoconservation étaient validés.

Cryopreservation of germinal stem cells in rainbow trout: a strategy to entirely restore a genotype of interest

Anne-Sophie GOUPIL¹
Stéphanie KICA¹
Tina TERRENNE²
Lionel GOARDON²
Alexandra DEPINCÉ¹
Charlène LABESSE¹
Jean-Jacques LAREYRE¹
Catherine LABBÉ²

CORRESPONDENCE

catherine.labbe@inrae.fr

jean-jacques.lareyre@inrae.fr

ABSTRACT

Cryobanking of fish genetic resources relies exclusively on sperm cryopreservation, as the cryopreservation of oocytes and embryos is not possible in these species with telolecithal eggs. However, the cryopreservation of germinal stem cells is achievable, because they are structurally less complex than fish oocytes and embryos. In addition, it is shown that when germinal stem cells are injected into the peritoneal cavity of recipient fries, they colonize the fry gonads and undergo gametogenesis, thereby leading to the production of functional gametes. In the course of building the infrastructure of BRC Anim, the animal component of the AgroBRC/RARe infrastructure, a method for germinal stem cell cryopreservation was set up for rainbow trout. Here, we present and comment the final procedure that was adopted: the extenders were devoid of animal products, thawed cell quality was validated, and their ability to colonize recipient gonads was demonstrated. The cryopreservation strategy described enables the cryobanking of biological materials that support the regeneration of a complete genotype of interest after cryopreservation in fish.

KEYWORDS

Cryobank, Genetic resources, *Oncorhynchus mykiss*, Fish.

1 INRAE, Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons LPGP, UR1037, 35 000 Rennes.

2 INRAE, UE PEIMA, 29450 Sizun.

Ce travail a été initié et encouragé par Florence Le Gac, décédée le 9 juillet 2018 alors que les premiers succès de greffe après cryoconservation étaient validés.

Introduction

Chez les poissons, la cryoconservation du sperme est globalement maîtrisée chez les espèces d'intérêt aquacole et pour la recherche. Ce matériel biologique est donc désormais utilisé en routine pour conserver les ressources génétiques aquacoles, même si des améliorations sont encore recherchées ponctuellement. En France, la Cryobanque Nationale et ses partenaires aquacoles (INRAE, SYSAAF - syndicat des sélectionneurs avicoles et aquacoles français -) ont été à l'origine de la création d'une cryobanque centralisée, rassemblant la majorité des ressources génétiques aquacoles françaises sous forme de semence cryoconservée. Cependant, aucune méthode à l'heure actuelle ne permet de cryoconserver des ovules matures fonctionnels ou des embryons entiers chez les poissons, en raison de la présence d'un compartiment vitellin imperméable aux cryoprotecteurs, et dont la moindre perturbation affecte le développement embryonnaire (Martinez-Paramo et al., 2017). La régénération d'individus porteurs d'un génotype d'intérêt suppose donc de croiser le sperme cryoconservé avec des ovules frais de la même origine génétique, afin de produire les alevins attendus. Or, le maintien de la diversité génétique via les ovules frais, par conservation de cheptels femelles en pisciculture, est très lourd, coûteux et peu sûr sur le long terme. En l'absence de ces géniteurs, la régénération de la ressource génétique à partir du seul sperme cryoconservé, utilisé avec des ovules d'une origine génétique différente, ne permettra de restaurer que 50 % du génotype donneur à la première génération. De plus, le génome mitochondrial d'origine sera perdu, car il est transmis uniquement par voie maternelle.

Différentes biotechnologies visant à contourner cet écueil ont été développées ces 30 dernières années (Labbé et al., 2012 ; Labbé, 2013), dont l'androgénèse (injection de 1 ou 2 spermatozoïdes dans des ovules dont l'ADN a été inactivé), la greffe de cellules germinales souches embryonnaires

et adultes, et le transfert nucléaire (injection du noyau d'une cellule somatique dans un ovule dont l'ADN a été inactivé). Pour autant, beaucoup de ces technologies sont toujours au stade de la recherche ou bien offrent des rendements de succès ou de conformité génétique encore peu compatibles avec une utilisation en routine pour la conservation des ressources génétiques. L'une de ces méthodes, la greffe de cellules germinales souches adultes, s'avérait cependant particulièrement prometteuse d'après les succès rapportés par l'équipe japonaise du Dr. Goro Yoshizaki (Okutsu et al., 2006a). Le principe de cette technologie est schématisé dans la figure 1.

L'intérêt de la régénération d'une population par greffe de cellules germinales souches est que, quel que soit le génotype des individus greffés, les gamètes produits contiennent l'intégralité du génome présent dans les cellules cryoconservées. De plus, lors de l'ovogénèse d'une femelle greffée, les ovogonies formées porteront l'ADN mitochondrial de la cellule souche dont elles sont issues, et transmettront ce patrimoine mitochondrial à la descendance. Enfin, les cellules germinales souches étant de taille et de structure proches de celles de cellules somatiques, leur cryoconservation ne soulève pas les écueils rencontrés pour les ovules ou les embryons (Okutsu et al., 2007).

Les promesses portées par les cellules germinales souches adultes vis-à-vis de la conservation des ressources génétiques chez les poissons (Yoshizaki et al., 2011 ; Lacerda et al., 2013) nous ont conduits à explorer cette voie pour la rendre opérationnelle en cryobanque. Dans le cadre du Projet Investissements d'Avenir CRB Anim, qui a soutenu le développement du pilier animal de RARE, nous avons analysé le potentiel de différentes méthodes de cryoconservation, en orientant certaines stratégies pour s'adapter aux prérequis du CRB Cryobanque Nationale et de ses sites secondaires, membres de CRB-Anim. Cela inclut i) une possibilité de collecte à grande échelle du matériel biologique, par un personnel polyvalent, ii) la biosécurité du matériel conservé (élimination des produits d'origine

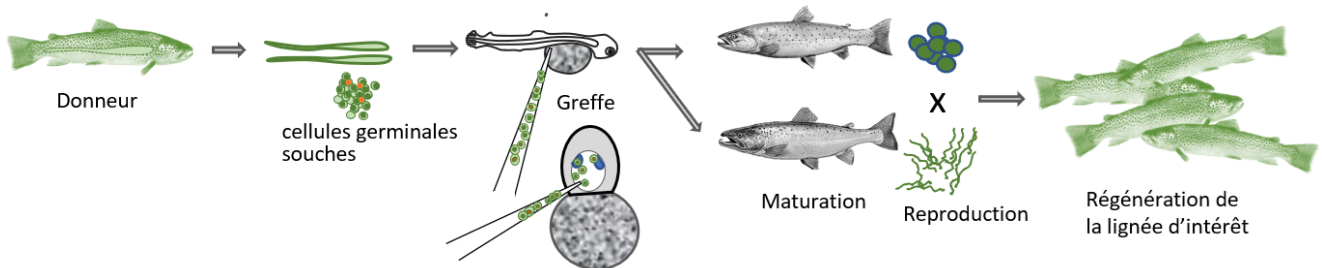


Figure 1. Principe de la greffe de cellules germinales souches (selon Okutsu et al., 2006a)

Les gonades de l'individu donneur adulte portant le génotype d'intérêt sont dissociées. La suspension cellulaire obtenue, contenant une petite proportion de cellules germinales souches (figurées en orange), est injectée dans la cavité abdominale (disque blanc) d'un alevin receveur. Les cellules germinales souches vont intégrer les gonades immatures du receveur (zones bleues), par un mécanisme encore mal connu, et initier la production de gamètes fonctionnels.

animale), iii) la compatibilité des contenants avec les espaces de stockage disponibles (paillettes notamment), et iv) la préservation du potentiel reproducteur des cellules germinales souches, c'est-à-dire leur capacité à coloniser les gonades d'alevins receveurs et à se différencier en gamètes fonctionnels. Ce travail a été réalisé chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), une espèce à fort intérêt économique en France et un modèle important pour la recherche aquacole, induisant la création de nombreuses lignées expérimentales.

Stratégie de cryoconservation et résultats

Choix des individus donneurs de cellules

Il a été montré que la greffe de cellules germinales souches testiculaires de mâles adultes pouvait logiquement conduire à la production de sperme, mais que ces cellules étaient aussi capables de se différencier en ovules si elles sont greffées dans un alevin femelle (Okutsu et al., 2006a). L'inverse est vrai pour les cellules germinales souches de l'ovaire de femelles adultes (Lee et al., 2016), ce qui prouve la bipotence de ce matériel biologique. Cette propriété est précieuse, car même si un seul sexe est disponible chez les individus donneurs pour la cryoconservation, du sperme ou des ovules pourront être obtenus dans tous les cas, en jouant sur le sexe des receveurs. Chez les espèces à déterminisme sexuel XY comme la truite arc-en-ciel, les cellules germinales souches testiculaires sont le premier matériel à considérer, car elles contiennent l'information génétique portée par le chromosome Y, contrairement aux ovogonies. Nos récentes observations indiquent, en outre, que le nombre de cellules germinales souches présentes dans un testicule de mâles adultes sexuellement immatures peut être jusqu'à 1 000 fois plus élevé, à poids de tissus équivalent, que dans un ovaire (Lareyre et al., communication personnelle). Il est aussi recommandé de travailler avec des individus adultes immatures, c'est à dire peu avancés dans leur gamétogénèse, afin de ne pas diluer les suspensions cellulaires avec d'autres cellules spermatiques ou des ovocytes vitellogéniques. Enfin, les cellules germinales souches adultes sont préférables aux cellules souches embryonnaires (ou PGCs pour primordial germ cells), qui possèdent pourtant les mêmes capacités de greffe (Takeuchi et al., 2004). En effet, les gonades adultes sont plus aisées à collecter par un opérateur non expérimenté que les fils translucides constituant les gonades embryonnaires. De

plus, les premières permettent d'obtenir plusieurs milliers de cellules souches à partir d'un individu (dans nos conditions), contre moins de 90 cellules souches par embryon et dans une fenêtre développementale très réduite (Okutsu et al., 2006b).

Préparation des cellules germinales souches

Notre équipe maîtrisait une méthode originale de purification de cellules germinales souches, basée sur le principe de l'élu-triation centrifuge⁴ de la suspension cellulaire testiculaire totale (Rolland et al., 2009 ; Bellaiche et al., 2014) (Figure 2). Cette maîtrise nous a permis de réaliser toutes les mises au point de la congélation sur une population cellulaire enrichie en nos cellules d'intérêt, et donc de cibler les analyses de viabilité sur ces cellules spécifiquement. Cela nous a affranchis du recours à l'utilisation d'animaux transgéniques possédant des cellules germinales souches fluorescentes, utilisés jusqu'alors pour évaluer les survies des cellules germinales souches à la décongélation (Okutsu et al., 2007 ; Lee et al., 2013). Cette étape d'élu-triation centrifuge nécessite un matériel peu répandu et un personnel formé, qui ne seront pas forcément disponibles lors de congélations de routine en cryobanque. C'est pourquoi dans un second temps, nous avons vérifié que les suspensions de cellules testiculaires totales pouvaient être utilisées de la même façon et avec les mêmes taux de succès reproducteur que les cellules purifiées.

Mise au point de la cryoconservation



Figure 2 : Purification des cellules germinales souches
Les testicules de plusieurs mâles sont mélangés et dilacérés, avant une dissociation enzymatique puis mécanique des cellules. Les cellules sont ensuite séparées, selon leur taille et leur densité, par une centrifugation associée à un contre-courant de milieu de culture. La fraction enrichie en cellules germinales souches est retenue pour les tests de congélation.

⁴ Il s'agit d'une centrifugation associée à un contre-courant de milieu. La force centrifuge qui s'exerce sur les cellules est contre-carrée par la force centripète du courant de milieu se dirigeant vers le centre du rotor. Un faible débit de contre-courant induit la sortie vers le centre des cellules les plus petites ; l'augmentation progressive du débit permet ensuite la sortie des cellules les plus grosses, telles que les cellules germinales souches.

Critères de qualité

Les paramètres permettant d'évaluer la qualité des cellules décongelées doivent être soigneusement choisis au regard des cellules considérées. Dans le cas des cellules germinales souches, moins abondantes que les spermatozoïdes (quelques milliers contre plusieurs milliards par individu) et dont la prolifération en culture n'est pas encore maîtrisée, un paramètre important est le taux de récupération des cellules. Il permet d'évaluer combien de cellules ont éclaté (non retrouvées à la décongélation), ces disparues étant bien sûr absentes des analyses habituelles de viabilité. Un second critère choisi a été le maintien de la taille et de la structure des cellules. Enfin, le dernier paramètre que nous avons retenu est l'intégrité de la membrane plasmique, révélée par l'imperméabilité des cellules à un fluorochrome, l'iodure de propidium. Ces trois paramètres peuvent être analysés sur une petite fraction cellulaire et en une seule fois par cytométrie en flux (Figure 3), selon des critères faciles à paramétrer. Ils peuvent également être utilisés facilement sur une fraction du matériel en sortie de cryobanque, juste avant l'utilisation des cellules. L'évaluation du potentiel reproducteur est traitée plus loin.

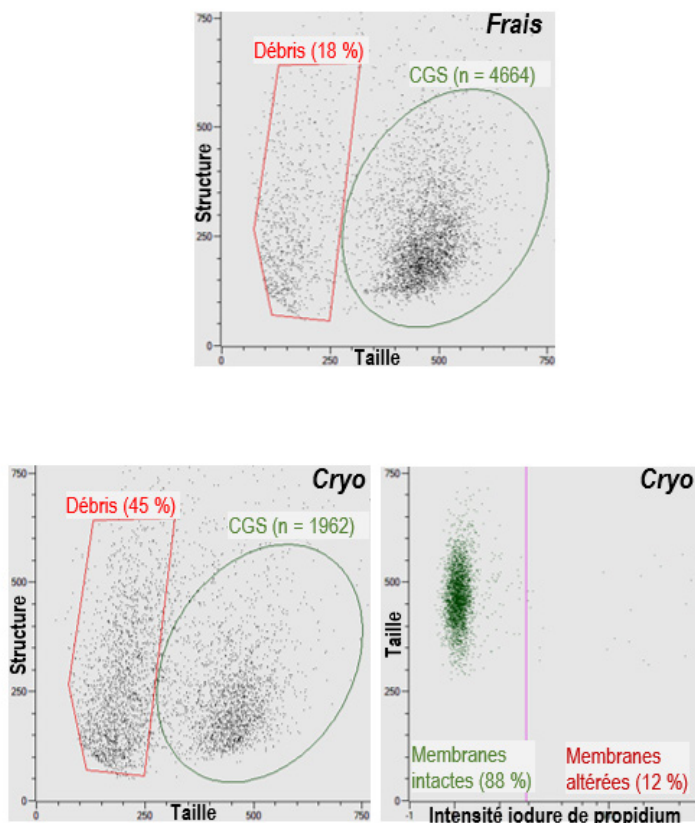


Figure 3 : Exemple de profil de cytométrie en flux de cellules germinales souches (CGS) fraîches (Frais, en haut) et cryoconservées (Cryo, en bas).

Après congélation, la fenêtre des CGS ne contient plus que 42 % des cellules initiales (1962/4664), et la proportion de débris a augmenté. Si l'on ne regarde que la qualité des CGS obtenues (à droite), on conclura que 88 % des cellules décongelées sont viables (membranes intactes). Mais, le véritable rendement de cette congélation est de 37 % (42 % de cellules, viables à 88 %).

Choix des conditions de congélation

Il est souvent difficile de reproduire les résultats de congélation de travaux publiés, car les équipements de congélation peuvent différer, le matériel biologique peut être de qualité différente et la variabilité (aléas) des procédures est rarement traitée dans les publications. Nous avons choisi de tester dans nos conditions : le protocole publié par Lee et al. (2013), deux méthodes que nous maîtrisons, l'une pour la congélation de cellules embryonnaires isolées (Leveroni-Calvi et al., 1998) et l'autre pour les cellules somatiques (Mauger et al., 2006) chez la truite arc-en-ciel, et une méthode mise au point pour les PGCs (Riesco et al., 2012). À ces procédures de référence, nous avons ajouté le testage d'une congélation en paillettes 500 μ L (en remplacement des cryotubes habituellement utilisés), et le remplacement des additifs d'origine animale par un milieu synthétique à base d'acide hyaluronique, le Cryo3 (Stem Alpha, France). Les différents paramètres testés sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Liste des différents paramètres testés pour la cryoconservation des cellules germinales souches. La combinaison retenue est signalée par*. L'ensemble de la procédure mise au point, incluant la composition du milieu et la vitesse de congélation, est disponible auprès des auteurs (C. Labbé) ou par le portail des collections de CRB Anim <https://crb-anim.fr/access-to-collection/#/>.

CRYOPROTECTEURS	ADDITIFS	CONTENANTS	MODES DE CONGÉLATION
DMSO	BSA	Cryotubes	Radeau
Propane 1,2-diol*	Jaune d'œuf	Paillettes 500 μ L*	Azote liquide (vitrification)
	Cryo3* (Stem Alpha)	Paillettes 250 μ L	Congélateur -80 °C (freeze box)
	PVP 40 000*		Congélateur programmable*
	FBS		

Résultats

La méthode optimale de cryoconservation a été très complexe à définir en raison des critères de qualité que nous nous étions fixés, incluant i) un rendement élevé de récupération des cellules germinales souches, ii) une qualité maximale des cellules survivantes, iii) une quantité de débris réduite (pour limiter la compétition entre débris et cellules dans la cavité du receveur greffé), iv) une capacité des cellules à survivre pendant 1 à 2 jours post-décongélation (pour mimer un temps théorique d'incorporation tissulaire post greffe). Le meilleur compromis a été trouvé avec une procédure de congélation très lente en congéla-

teur programmable, en paillettes 500 μ L, sans induction de nucléation, et avec une solution cryoprotectrice à base de propane 1,2-diol et de Cryo3 (Tableau 1). Nos meilleurs rendements de récupération ont atteint 83 % des cellules fraîches, mais certaines expériences avec un matériel plus fragile, moins bien conservé lors de sa préparation, ont induit des rendements de 10 à 40 % seulement. Ces aléas de rendements seront à prendre en compte lors de la constitution de collections en cryobanque, car la qualité initiale de la préparation cellulaire vis-à-vis de son aptitude à la cryoconservation est difficile à évaluer (aucun critère fiable identifié). En revanche, la qualité des cellules décongelées est toujours proche (70 %) ou identique (100 %) au frais, et s'accompagne d'un taux très réduit de débris cellulaires. Cela signifie que, malgré des pertes d'amplitude variable, le matériel présent à la décongélation (après lavages) est de bonne qualité. Pour autant, même la meilleure méthode n'a pu empêcher une perte de 1/2 et 2/3 des cellules 24 h et 48 h post-décongélation respectivement, quels que soient nos efforts d'amélioration. Nous avons cependant observé, par la suite, que ces faibles survies ne sont pas un obstacle au succès de la greffe (voir ci-dessous).

Stratégie de régénération de la ressource génétique

Choix du receveur idéal

Au regard de la lourdeur technologique de la greffe (équipement de micromanipulation, formation de personnels à la microinjection, anticipation de la production des alevins receveurs et élevage jusqu'à leur maturité sexuelle), nous pensons que la restauration d'une lignée doit, autant que possible, utiliser la greffe pour assurer la production d'ovules seulement, la voie mâle étant apportée par du sperme cryoconservé de la même lignée. Ainsi, la greffe dans des alevins femelles permet de réduire de moitié le nombre d'individus greffés, et donc également la taille du cheptel à élever jusqu'à maturité. Cela permet, de plus, de réduire de moitié le matériel biologique (gonades immatures) nécessaire au moment de la congélation. Il apparaît donc judicieux d'utiliser des alevins receveurs issus de populations appelées monosexue femelle. Ces populations sont couramment produites en pisciculture, et donc aisément disponibles, grâce à une technologie d'inversion sexuelle permettant de produire des mâles XX dont la descendance sera uniquement femelle.

Un autre requis pour faciliter la restauration d'une lignée est que 100 % des ovules produits par la femelle soient issus des cellules germinales souches greffées, ce qui évite de trier les descendants après fécondation (par tests

génétiques ou phénotypiques). Il est donc nécessaire de disposer d'alevins receveurs stériles (ne produisant pas de gamètes), mais qui ont gardé la capacité à développer des ovaires fonctionnels. Ces populations stériles sont, elles aussi, disponibles en routine en pisciculture : un processus de triploïdisation des embryons juste après la fécondation est mis en œuvre par application d'un choc de pression hyperbare aux œufs fécondés (Chourrou, 1984), ce qui inhibe l'expulsion du second globule polaire de l'ovule. Les ovaires de ces femelles triploïdes se développent normalement, mais ils ont un aspect vide, car leurs ovocytes dégénèrent en début de méiose, avant l'initiation de la vitellogénèse (Lincoln et Scott, 1984). Les ovaires des animaux triploïdes gardent cependant leur capacité à produire des ovules fonctionnels après greffe de cellules germinales souches diploïdes (Okutsu et al., 2007).

Succès reproducteur des cellules germinales souches testiculaires cryoconservées

Après décongélation, la microinjection des cellules germinales souches est délicate, car ces cellules sont souvent contaminées par un gel d'ADN libéré des cellules altérées, provoquant l'occlusion du microcapillaire. L'ajout de DNase et la réduction de la concentration des cellules injectées font partie des ajustements nécessaires. Au final, les résultats de greffe sont excellents, puisque 89 % des femelles greffées avec des cellules germinales souches purifiées, cryoconservées dans la condition retenue, présentent des ovocytes diploïdes capables d'initier leur vitellogénèse (Figure 4), contre 78 % chez les femelles greffées avec des cellules fraîches. L'importance des colonisations est variable d'une femelle à l'autre, que ce soit chez les lots cryoconservés (Figure 4) ou chez les lots frais, mais il a été montré par ailleurs, dans l'équipe, que cela avait très peu d'incidence sur la quantité et la qualité des ovules produits in fine (Lareyre et al., communication personnelle).

Évolutions stratégiques : la cryoconservation de fragments testiculaires

Le choix de mettre au point la cryoconservation de cellules germinales souches testiculaires, que ce soit sous leur forme purifiée (enrichies par élutriation) ou sous forme d'une suspension de tous les types cellulaires testiculaires, présentait l'avantage d'une certaine sécurité. En effet, leur manipulation était maîtrisée dans l'équipe, et un savoir-faire important est disponible quant à la cryoconservation de cellules isolées (PGCs, cellules embryonnaires isolées, spermatozoïdes, cellules somatiques cultivées...). L'intérêt réside également dans une phase de restauration

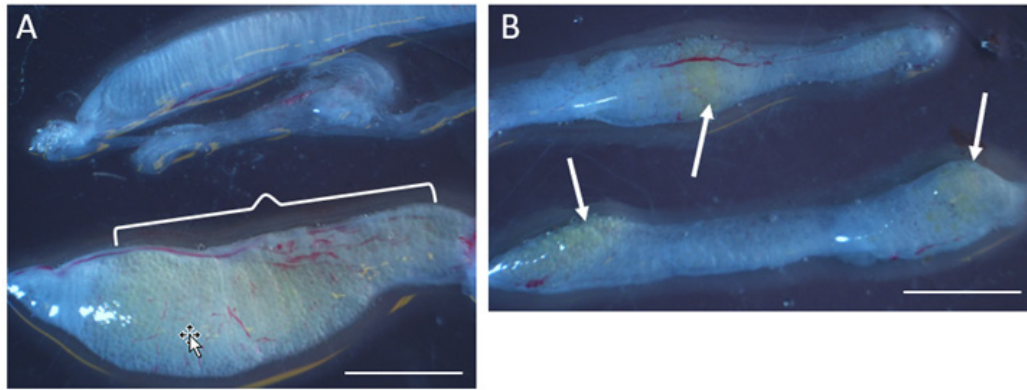


Figure 4. Exemple d'ovaires de truites stériles de 1 an, greffées au stade alevin avec des cellules germinales souches testiculaires cryoconservées. A : l'ovaire droit (au-dessus) présente des lamelles ovigères (stries) d'aspect vide, car aucun ovocyte en vitellogénèse n'est présent, tandis que l'ovaire gauche (au-dessous) est largement colonisé par des ovocytes vitellogénétiques (d'aspect orangé) (accolade blanche). B : Autre exemple où les deux ovaires comportent quelques îlots d'ovocytes vitellogénétiques (flèches). Barre d'échelle : 5 mm.

relativement simplifiée avec ce matériel, puisqu'il suffit de décongeler les cellules, de les laver et de les injecter dans les alevins receveurs. A contrario, la phase de préparation du matériel avant congélation imposée par cette stratégie peut constituer un frein à l'entrée en cryobanque d'une quantité importante de matériel. Il nous a donc semblé judicieux, dans un second temps, de développer une méthode de cryoconservation de fragments testiculaires, afin que l'étape de digestion des tissus et de dissociation des cellules soit reportée au moment de la décongélation, lorsque le besoin de restauration de la lignée est avéré.

Une difficulté importante, avec les fragments testiculaires, a été d'évaluer les rendements de récupération de cellules qui permettaient de discriminer les conditions, du fait de la grande hétérogénéité des contenus cellulaires entre fragments, y compris au sein d'un même individu. Nous avons cependant pu établir une méthode répétable de cryoconservation lente de fragments testiculaires, basée sur la méthode en cellules isolées en congélateur program-

mable (Figure 5, Planer), avec du Cryo3, et en cryotubes. Nous avons aussi éliminé le recours à la congélation de testicules entiers ou la congélation en boîte de congélation à -80 °C (Figure 5, CCBox), pour cause de rendements trop faibles ou trop aléatoires en termes de probabilité de succès. Les meilleurs rendements cellulaires obtenus sont bas, 1-4 % de cellules totales récupérées par rapport au frais. Ces taux restent cependant acceptables pour l'entrée de matériel en cryobanque. Ils impliquent de cryoconserver les testicules d'environ 90 poissons (âgés de 9 mois) pour obtenir un nombre de cellules décongelées suffisant pour greffer 200 alevins (donnant des centaines de descendants chacun).

Nous avons finalement testé une dernière stratégie de congélation, la vitrification. L'avantage de la vitrification est qu'elle suppose de plonger directement les tissus dans l'azote liquide (stérile), ce qui nous affranchit du congélateur programmable nécessaire pour la congélation lente. La congélation par vitrification consiste à limiter au maximum

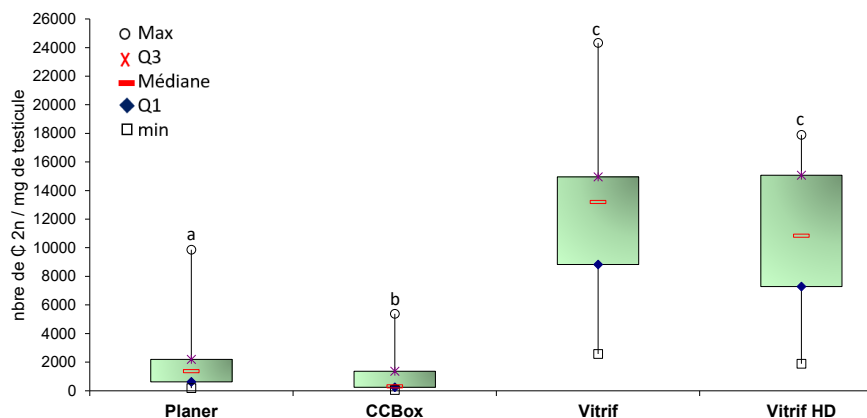


Figure 5. Performances des différentes méthodes de fragments testiculaires mises au point. Congélation lente en congélateur programmable (Planer) et en boîte de congélation à -80 °C (CCbox) ; Congélation par vitrification en brochettes (Vitrif) et par vitrification en système à haut débit (Vitrif HD).

la formation de cristaux de glace, en procédant à une descente en température extrêmement rapide, et en utilisant des cryoprotecteurs perméants à très forte concentration, pour inhiber la croissance des cristaux. Un écueil de la vitrification est que l'usage de concentrations élevées de cryoprotecteurs peut être toxique pour les cellules, et qu'il est très difficile d'assurer une congélation/décongélation assez rapides pour empêcher la formation de glace. Afin d'assurer les meilleurs échanges thermiques entre les fragments testiculaires et l'azote liquide ou le milieu de décongélation, nous avons d'abord testé la vitrification en « brochettes » (Wang et al., 2008 ; Liu et al., 2012 ; Marinovic et al., 2018) où des fragments d'une vingtaine de milligramme sont enfilés séparément sur une aiguille d'acupuncture, avant im-



Figure 6. Fragments testiculaires sur les aiguilles d'acupuncture dans le bain de cryoprotecteur.

mersion dans différents bains de cryoprotecteurs puis dans l'azote liquide (Figure 6).

Cette procédure de vitrification en brochettes nous a permis, contre toute attente au vu des aléas de la vitrification, d'augmenter jusqu'à 10 fois les taux de récupération de cellules totales (Figure 5, Vitrif). Nous avons ensuite adapté ce protocole, afin d'alléger la procédure de mise en brochettes très longue à mettre en œuvre et source de risque de dégradations et donc de variabilité (manipulation hors du milieu, hors du froid). La procédure finale retenue, basée sur un

système de plongeur refroidi et de manipulation de plusieurs dizaines de fragments en paniers, est plus adaptée à l'entrée en cryobanque de grande quantité de matériel, et elle nous a donné les mêmes rendements de récupération que la procédure en brochettes (Figure 5, Vitrif HD),

Application à la conservation en conditions de terrain

La cryoconservation de fragments testiculaires, et la décongélation et greffe des cellules ont été testées en condition de terrain, à la pisciculture expérimentale INRAE PEI-MA. Un personnel formé et habilité pour le sacrifice et la dissection des poissons a réalisé la collecte des testicules. D'après les taux de récupération attendus à la décongélation, nous avons estimé à 10 le nombre de mâles de 9 mois nécessaires pour greffer 180 alevins (obtention de 1,2 g de testicules immatures, collecte réalisée en 30 min). La vitrification à haut débit a été réalisée sur le site, dans un bain d'azote liquide, suivie d'un stockage en cryotubes sous azote liquide. Le lendemain, les fragments ont été décongelés par immersion dans des bains successifs de milieu de décongélation, et ils ont été dissociés enzymatiquement et mécaniquement par un personnel de laboratoire, avec un taux de récupération de 8 500 cellules/mg de testicule (17 % du frais). La greffe dans des alevins receveurs a été réalisée le jour même par une personne de la pisciculture qui avait été préalablement formée à la micromanipulation par notre équipe. Cette personne, avec l'aide d'un préposé à la préparation des alevins et des cellules, a greffé les 180 alevins en moins de 60 min. Les survies des alevins ont été conformes aux résultats habituels de greffe : 42 % de survivants à 4 mois, puis rares mortalités jusqu'à 12 mois. Pour cette expérience de terrain, nous avons greffé des alevins mâles et femelles. Après 1 an, les receveurs triploïdes greffés présentaient des ovocytes vitellogéniques (receveurs femelle) ou des cellules spermatogoniales diploïdes (receveurs mâles), et la proportion de receveurs positifs a été équivalente entre greffés avec des cellules cryoconservées et avec des cellules fraîches (Figure 7). Cela confirme donc les excellents résultats que nous avons déjà obtenus après cryoconservation de suspensions de cellules testiculaires enrichies en cellules germinales souches.

Le potentiel reproducteur des cellules cryoconservées a été testé un an après la greffe, du fait de difficultés à maintenir tous les lots expérimentaux en élevage pendant les 2 et 3 années nécessaires à l'obtention de spermatozoïdes et ovules matures. Pour confirmation, des lots issus de cryoconservation sont cependant toujours en élevage à

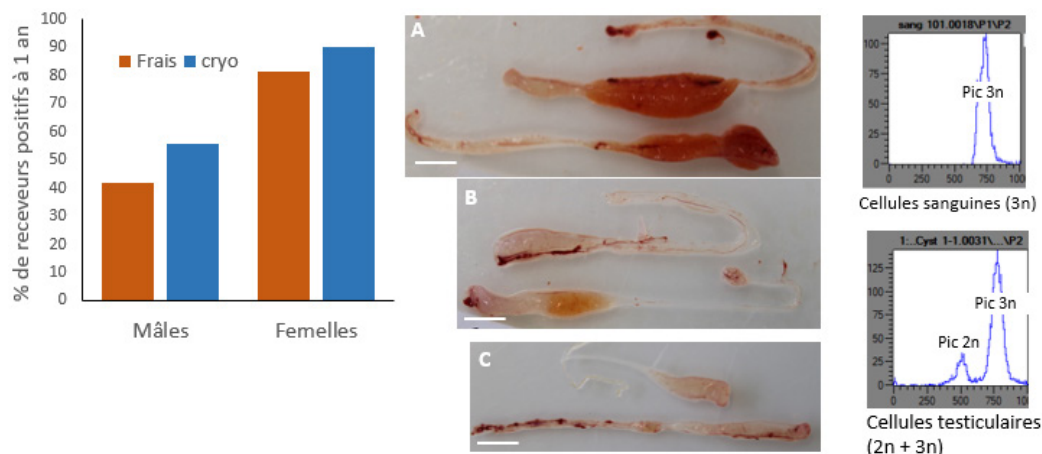


Figure 7. Succès de développement de gamètes après greffe de cellules testiculaires totales issues de testicules frais (Frais) ou vitrifiés (cryo), en conditions de pisciculture (graphe de gauche).

Les animaux âgés de 1 an ont été phénotypés comme suit : chez les femelles, le développement d'ovocytes vitellogéniques permet de discriminer visuellement les gonades colonisées (photos A et B) des gonades négatives (photo C) (barre d'échelle 5 mm) ; chez les mâles, la présence de cellules spermatogoniales diploïdes doit être recherchée par cytométrie en flux (cytogrammes à droite). La nature triploïde du receveur est attestée par le pic unique de cellules sanguines en position 3n (haut). La présence de cellules diploïdes (2n) parmi les cellules testiculaires (bas) atteste de la colonisation des gonades et de la prolifération des cellules germinales souches greffées.

INRAE PEIMA (croissance et survies normales), et notre expérience en frais nous laisse augurer des taux de succès similaires entre les observations à 1 an et les observations à maturité. De plus, malgré le succès de la vitrification à haut débit et son applicabilité, quelques ajustements techniques peuvent encore être apportés. Par exemple, les fragments testiculaires vitrifiés, qui se manipulent comme des perles, ont été regroupés dans des cryotubes. Leur incorporation dans des paillettes 1 ml (IMV Technologies) est prévue, pour un stockage dans les mêmes containers que les paillettes de semence.

Conclusion

L'ensemble de ce travail a conduit à définir deux procédures de cryoconservation de cellules germinales souches, l'une sur cellules testiculaires isolées, l'autre sur fragments testiculaires ; toutes deux permettent un succès de colonisation des gonades des receveurs équivalent aux contrôles frais (Tableau 2). À ce stade, ces méthodes peuvent déjà être utilisées pour l'entrée en cryobanque de ce matériel indispen-

sable à la conservation complète de différents génotypes chez les poissons. Pour autant, les étapes de dissection de gonades, de dissociation cellulaire et de greffe des alevins restent exigeantes techniquement. Une réflexion est en cours sur l'organisation à mettre en place pour intégrer cette technologie à l'offre des centres de congélation aquacoles, et pour la rendre disponible sur certains sites piscicoles.

La greffe permet la production de gamètes fonctionnels et alimente certaines questions scientifiques de l'équipe. Par exemple, la façon dont les cellules germinales souches intègrent la gonade larvaire n'est pas connue. On ignore si les cellules sont incorporées avec leur propre niche (cellules de Sertoli), si elles s'intègrent dans des régions fragilisées de la gonade receveuse, et si elles s'intègrent en paquet dans un îlot donné ou individuellement. Ces interrogations ont pour corollaire la diversité génétique des gamètes régénérés, car on ignore encore s'ils sont issus de tous les mâles représentés dans le pool testiculaire ou de seulement quelques-uns (des travaux utilisant des mélanges de cellules germinales souches issues de donneurs de lignées isogéniques diff-

Tableau 2 : Caractéristiques des méthodes de cryoconservation des cellules germinales souches testiculaires (CGS)

Animal donneur / Receveur	Mâles adultes sexuellement immatures / Alevins femelles triploïdes stériles		
Matériel biologique utilisé pour la cryoconservation	CGS enrichies par élutriation	Fragments testiculaires	Fragments testiculaires
Mode de congélation	Lent, en paillettes 500 µL	Lent, en cryotubes	Rapide, vitrification à haut débit
Rendements de récupération de cellules à la décongélation	10-83 %	1-4 %	10-40 %
Potentiel reproducteur / frais (% de gonades colonisées à 1 an)	100 %	Non testé	100 %
Nombre de donneurs de 9 mois nécessaires pour 180-200 receveurs	10	90	10

rentes sont en cours). Un autre axe de recherche concerne la pérennité des collections lorsque le matériel est décongelé. Il serait particulièrement précieux de pouvoir dériver une partie des cellules décongelées pour les mettre en culture, les faire proliférer et les recongeler. Cela éviterait de devoir attendre le développement des descendants pour régénérer la collection. Des stratégies originales de culture en organoïdes sont à l'étude dans l'équipe. De même, l'intégrité épigénétique des gamètes produits par greffe est un élément de recherche en cours, notamment au niveau de la méthylation de l'ADN, du fait de l'importance de cette marque pour l'embryon (Labbé et al., 2017).

La diffusion de cette stratégie de conservation à d'autres espèces est bien sûr envisagée, d'autant plus que le nombre d'espèces aquacoles domestiquées augmente. On peut considérer que la cryoconservation des fragments testiculaires devrait être adaptable, du fait des similitudes tissulaires des testicules de différentes espèces. En revanche, nous avons déjà l'expérience d'espèces dont les alevins sont très petits, ou très fragiles vis-à-vis de l'injection, ce qui rend ces espèces difficiles à régénérer par greffe. Des études sont initiées dans l'équipe, et dans la communauté internationale (revu par Yoshizaki et Yasawa, 2019), pour développer la greffe interspécifique : les cellules germinales souches de l'espèce d'intérêt sont greffées à des alevins d'une espèce proche dont l'élevage est aisé et maîtri-

sé. Les applications en aquaculture sont majeures pour la conservation, mais aussi pour raccourcir l'intervalle entre générations d'espèces à puberté tardive, ou pour produire des individus génétiquement stériles ou issus d'espèces dont la maturation sexuelle finale n'est pas maîtrisée (Yoshizaki et Yasawa, 2019).

Il convient de préciser, cependant, que le recours à la cryoconservation de cellules germinales souches adultes peut être empêché en l'absence d'animaux donneurs à des stades adaptés, ou face à des individus particuliers dont le sacrifice n'est pas envisageable. Une stratégie complémentaire à l'étude est la cryoconservation de cellules de peau (nageoires), car les fragments de nageoires sont disponibles et collectables à haut débit, sans sacrifier l'animal et quels que soient son âge et son sexe. Ces cellules somatiques impliquent, toutefois, de maîtriser la régénération par transfert nucléaire (Martinez-Paramo et al., 2017), et notamment de surmonter les difficultés liées à l'obtention de descendants intègres épigénétiquement (Depincé et al., 2021) et génétiquement (perte de l'ADN mitochondrial). L'ensemble de ces études, incluant les promesses des unes et les progrès des autres, permettent d'envisager, à terme, la mise à disposition d'un choix de technologies de la conservation adaptées aux contraintes des espèces et au contexte environnemental et sociétal dans lequel elles seront mises en œuvre. ■

Remerciements

Ce travail a été financé par le PIA CRB Anim ANR-11-INBS-0003, par les projets européens AQUAEXCEL2020 et AQUAEXCEL3.0, et par le projet FEAMP BIOGERM mesure 47 (Innovation Aquaculture). Les auteurs remercient les personnels des installations expérimentales de INRAE LPGP et de la pisciculture INRAE PEIMA pour le soin apporté à la production des donneurs, des receveurs et à l'élevage des précieux animaux greffés.

Références

Bellaïche J., Lareyre J.J., Cauty C., Yano A., Allemand I. and Le Gac, F., 2014. Spermatogonial Stem Cell Quest: nanos2, Marker of a Subpopulation of Undifferentiated A Spermatogonia in Trout Testis. *Biology of Reproduction* 90. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116392>.

Chourrout D., 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture* 36, 111-126. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90058-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90058-9).

Depincé A., Le Bail P.-Y., Rouillon C. and Labbé, C., 2021. Embryonic fate after somatic cell nuclear transfer in non-enucleated goldfish oocytes is determined by first cleavages and DNA methylation patterns. *Sci Rep* 11, 3945. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83033-2>.

Labbé C., 2013. Spécificités de la cryoconservation des ressources génétiques chez les espèces aquacoles. *STAL Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire* 39, 67.

Labbé C., Robles V. and Herraéz M.P., 2017. Epigenetics in fish gametes and early embryo. *Aquaculture* 472, 93-106. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.026>.

Labbé C., Robles V. and Herraéz M.P., 2013. Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative cell sources for genome preservation, in: Allan, G., Burnell, G. (Eds.), *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Lacerda S.M.S.N., Costa G.M.J., Campos P.H.A., Segatelli T.M., Yazawa R., Takeuchi Y., Morita T., Yoshizaki G. and Franca L.R., 2013. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiol Biochem* 39, 3–11. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9606-4>.

Lee S., Iwasaki Y., Shikina S. and Yoshizaki G., 2013. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 1640–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218468110>?

Lee S., Katayama N. and Yoshizaki G., 2016. Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells. *Biochem Biophys Res Commun* 478, 1478–1483. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.156>.

Leveroni-Calvi S. and Maisse G., 1998. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres: Influence of embryo stage on postthaw survival rate. *Cryobiology* 36, 255–262.

Lincoln R.F. and Scott A.P., 1984. Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* 25, 385–392. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04886.x>.

Liu J., Cheng K.M. and Silversides F.G., 2012. Novel needle-in-straw vitrification can effectively preserve the follicle morphology, viability, and vascularization of ovarian tissue in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Animal Reproduction Science* 134, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.002>.

Marinovic Z., Lujic J., Kasa E., Csenki Z., Urbanyi B. and Horvath A., 2018. Cryopreservation of Zebrafish Spermatogonia by Whole Testes Needle Immersed Ultra-Rapid Cooling. *Jove-Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/56118>.

Martínez-Páramo S., Horváth Á., Labbé C., Zhang T., Robles V., Herráez P., Suquet M., Adams S., Viveiros A., Tiersch T.R. and Cabrita E., 2017. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture, Recent advances in fish gametes and embryo research* 472, 156–177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>.

Mauger P.E., Le Bail P.Y. and Labbe C., 2006. Cryobanking of fish somatic cells: optimizations of fin explant culture and fin cell cryopreservation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 144, 29–37.

Okutsu T., Shikina S., Kanno M., Takeuchi Y. and Yoshizaki G., 2007. Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science* 317, 1517.

Okutsu T., Suzuki K., Takeuchi Y., Takeuchi T. and Yoshizaki G., 2006a. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2725–2729.

Okutsu T., Yano A., Nagasawa K., Shikina S., Kobayashi T., Takeuchi Y. and Yoshizaki G., 2006b. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *J Reprod Dev* 52, 685–693.

Riesco M.F., Martínez-Pastor F., Chereguini O. and Robles V., 2012. Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. *Theriogenology* 77, 122–130.e2. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.024>.

Rolland A.D., Lareyre J.-J., Goupil A.-S., Montfort J., Ricordel M.-J., Esquerré D., Hugot K., Houlgatte R., Chalmel F. and Le Gac F., 2009. Expression profiling of rainbow trout testis development identifies evolutionary conserved genes involved in spermatogenesis. *BMC Genomics* 10, 546. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-546>.

Takeuchi Y., Yoshizaki G. and Takeuchi T., 2004. Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* 430, 629–630. <https://doi.org/10.1038/430629a>.

Wang Y., Xiao Z., Li L., Fan W. and Li S.-W., 2008. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Human Reproduction* 23, 2256–2265. <https://doi.org/10.1093/humrep/den255>.

Yoshizaki G., Fujinuma K., Iwasaki Y., Okutsu T., Shikina S., Yazawa R. and Takeuchi Y., 2011. Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 6, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.cbcd.2010.05.003>.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.