



Biological Resource Centers
for Domestic Animals

3rd International Seminar of CRB-Anim Infrastructure

Domestic Animals, Biobanks and Biodiversity

November 26th, 2019

Développement des outils de conservation des ressources génétiques aviaires basés sur les cellules germinales primordiales.

Govoroun Marina, UMR PRC, INRA 37380 Nouzilly

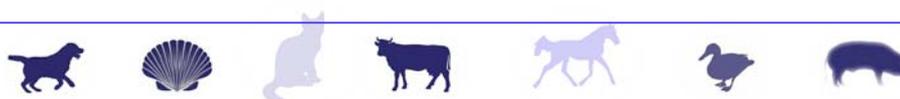
Introduction. En France la cryoconservation de la semence chez le poulet est bien maîtrisée. Elle présentait jusqu'à récemment le seul dispositif existant de la conservation des ressources génétiques aviaires. Cependant ce dispositif présente deux inconvénients : **i)** il ne permet pas la conservation du patrimoine génétique des femelles lié au chromosome sexuel spécifique W ; **ii)** la restauration des génotypes nécessite plusieurs backcross et peut prendre plusieurs années. Dans ce contexte la cryopréservation des cellules germinales primordiales (PGCs pour « chicken primordial germ cells ») diploïdes prélevées chez l'embryon précoce et amplifiées *in vitro* présente un grand intérêt comme une stratégie de conservation complémentaire à celle basée sur la semence. Les PGCs peuvent être transplantées après décongélation et réamplification en culture dans un embryon receveur, ou elles peuvent se développer jusqu'aux gamètes fonctionnels et donner la descendance (van de Lavoit et al., 2006, Whyte et al., 2015). L'utilisation de ce procédé seul ou combiné à l'utilisation de la semence congelée permettrait de restaurer les génotypes mâles et femelles d'intérêt en une seule génération.

Objectifs. Dans les projets CRB ANIM et les projets en connexion avec ce dernier (VALBIODI, région centre et IMAGE, H2020) les objectifs étaient **i)** de développer chez le poulet un dispositif complet de conservation et de restauration des ressources génétiques basés sur les PGCs en utilisant comme modèle une race locale en danger de disparition « la poule Noire du Berry » (NB); **ii)** de comprendre l'impact des étapes *in vitro* (culture, cryopreservation) sur les aspects moléculaires et physiologiques de la qualité des PGCs chez les deux sexes par les approches « omiques » et *in vivo* ; **iii)** alimenter la cryobanque nationale par les PGCs NB mâles et femelles.

Résultats. Nous avons développé, cryoconservé et mis en cryobanque les cultures de PGCs NB. Nous avons étudié les propriétés moléculaires des PGCs dans l'environnement *in vitro* par les approches à haut débit. Cette étude a révélé un dimorphisme sexuel important des PGCs dérivées en culture, malgré leur statut présumé des cellules germinales souches indifférenciées. Les études protéomique par LC-MSMS et transcriptomique par RNAseq ont montré des différences importantes d'abondance de protéines et de transcrits entre les PGCs mâles et femelles, suggérant leur détermination sexuelle autonome précoce, qui pourrait être à l'origine des différences sexuelles de leurs comportements en culture et *in vivo* décrites auparavant. L'étude de la méthylation d'ADN a montré que la durée de culture et la cryopréservation affectaient significativement le paysage épigénétique des PGCs. Cet impact était plus fort sur le méthylome des PGCs mâles, que sur celui des femelles. L'effet sexuellement dimorphique de la durée de culture était aussi observé du côté du transcriptome. En revanche, la cryopreservation n'avait que peu d'effet sur l'expression génique chez les deux sexes.

Pour évaluer les capacités reproductrices des PGCs NB conservées nous avons créé des chimères germinales en injectant ces PGCs décongelées et réamplifiées *in vitro* dans les embryons Rhode Island. La reproduction de ces chimères a donné le taux de transmission germinale allant jusqu'à 60,6% pour les PGCs NB femelles et jusqu'à 42,4% pour les PGCs NB mâles. Ces résultats montrent l'efficacité de la technologie mise en place et attestent du potentiel reproducteur bien conservé des échantillons mis en cryobanque. Le taux de transmission germinale semblait varier en fonction de la durée de culture d'une manière spécifique au sexe.

Perspectives. L'intégration des données obtenues devra permettre de comprendre les mécanismes moléculaires impactés dans les PGCs par les étapes *in vitro*. Ces connaissances seront utiles pour mieux adapter ces étapes à la physiologie des PGCs et améliorer leur qualité.





Biological Resource Centers
for Domestic Animals

3rd International Seminar of CRB-Anim Infrastructure
Domestic Animals, Biobanks and Biodiversity

November 26th, 2019

Development of the tools for conservation of avian genetic resources based on primordial germ cells.

Govoroun Marina, UMR PRC, INRA 37380 Nouzilly

Introduction. The cryopreservation of chicken sperm is well mastered in France. Until recently, this was only existing tool for the conservation of avian genetic resources. However, this method has two limitations: **i)** it does not allow the conservation of the genetic resources of female birds linked to the specific sex chromosome W; **ii)** restoring the genotype using frozen semen requires several backcrosses and take several years. In this context the cryopreservation of diploid primordial germ cells (PGCs) collected from the early embryo and amplified *in vitro* is of great interest as a conservation strategy complementary to the sperm-based biotechnology. After thawing and re-amplification *in vitro* PGCs can be transplanted in a recipient embryo, where they can develop to functional gametes and give offspring (van de Lavoie et al., 2006, Whyte et al., 2015). Using this process alone or in combination with the use of frozen semen would restore the male and female genotypes of interest in a single generation.

Objectives. In CRB ANIM project and projects in connection with the latter (VALBIODI, region Centre and IMAGE, H2020) the objectives were **i)** to develop a complete system for the conservation and restoration of chicken genetic resources based on PGCs, using as a model a local endangered breed "La Noire du Berry" (NB); **ii)** to understand the impact of the *in vitro* steps (culture and cryopreservation) on the molecular and physiological aspects of the quality of PGCs in both sexes by "omic" and *in vivo* approaches; **iii)** to enrich the collection of avian national cryobank by the male and female NB PGCs samples.

Results. We developed, cryopreserved and cryobanked cultures of PGCs NB. We investigated the molecular properties of PGCs in the *in vitro* environment using high throughput approaches. This study revealed an important sexual dimorphism of PGCs derived in culture, despite their presumed undifferentiated germ stem cells state. Proteomic LC-MSMS and transcriptomic RNAseq studies showed important differences in protein and transcript abundance between male and female PGCs that suggest their early autonomous sexual determination, which may be responsible for described previously sexual differences in their behavior in culture and *in vivo*. The study of DNA methylation showed that culture duration and cryopreservation significantly affected the epigenetic landscape of PGCs. This impact was stronger on the methylome of male PGCs than on that of females. The sexually dimorphic effect of culture duration was also observed on the transcriptome. In contrast, cryopreservation had little effect on gene expression in both sexes.

To evaluate the reproductive capacity of conserved PGCs NB, we created germline chimeras by injecting thawed and reamplified *in vitro* PGCs NB in Rhode Island embryos. Reproduction of these chimeras resulted in germline transmission rate of up to 60.6% for female PGCs NB and up to 42.4% for male PGCs NB. These results demonstrate the efficiency of the developed PGCs biotechnology and well conserved reproductive potential of *in vitro* derived cryopreserved PGCs. The transmission rate seems to vary according to the culture duration in a gender-specific manner.

Perspectives. The integration of the obtained data will allow to understand the molecular mechanisms impacted in the PGCs by the *in vitro* steps. This knowledge will be useful to better adapt these steps to the physiology of PGCs and improve their quality.

