

## PREMIERE CONSTITUTION D'UNE RESERVE GENETIQUE EX-SITU POUR L'ESPECE GALLUS-GALLUS

Blesbois Elisabeth<sup>1</sup>, Coquerelle Georges<sup>2</sup>, Seigneurin François<sup>3</sup>, Grasseau Isabelle<sup>1</sup>,  
Limouzin Claude<sup>4</sup>, Besnard Joel<sup>5</sup>, Gourichon David<sup>6</sup>, Sellier Nadine<sup>1</sup>,  
Le Bihan-Duval Elisabeth<sup>1</sup>, Mérat Laurence<sup>4</sup>, Rault Paul<sup>3</sup>, Tixier-Boichard Michèle<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UR SRA, <sup>3</sup>SYSAAF, <sup>5</sup>UE SRA, <sup>4</sup>UE PAP, <sup>6</sup>UE GFA, INRA 37380 NOUZILLY; <sup>2</sup>UMR GDA  
Domaine de Vilvert 78352 JOUY EN JOSAS

### Première constitution d'une réserve génétique *ex-situ* pour l'espèce *Gallus-gallus*

L'objectif était de mettre en place une collection patrimoniale *ex situ* de races et de lignées aviaires rassemblant des échantillons de semence et de sang congelés dans des conditions sanitaires et de qualité optimales.

Trois lignées expérimentales de statut sanitaire contrôlé, importantes dans les recherches sur le métabolisme et la pathologie (R+, Y33 et B4) ainsi que la plus ancienne race patrimoniale française, la Gauloise Dorée, de statut sanitaire inconnu, ont été retenues. Le site INRA de Tours a été choisi comme site d'assainissement, d'élevage des animaux et de prélèvement des semences et sangs. Un protocole spécifique d'assainissement de la Gauloise Dorée a été mis en place comprenant un traitement anti-infectieux des parents, des œufs puis des jeunes afin de contrôler le portage de salmonelles et de mycoplasmes. Les animaux sains ont ensuite été élevés avec un programme de vaccination contre les principales maladies contagieuses du poulet avant prélèvements de semence et de sang. La méthode de congélation de la semence utilisait le cryoprotecteur glycérol. La semence, ainsi que des échantillons sanguins ont été congelés en paillettes 0,5 ml identifiées par lignée, année et numéro de donneur et stockés dans l'azote liquide au Centre de Ressources Biologiques de Touraine (CRBT) créé à cette occasion. Par la suite, pour des raisons de sécurité, la moitié des stocks sera conservée au site primaire de la cryobanque nationale d'animaux domestiques et l'autre au CRBT.

La semence de 8 à 25 mâles par lignée a ainsi été congelée, permettant le stockage d'un nombre variable de paillettes par mâle (6 à 55) et par lignée selon l'efficacité reproductrice. Des tests de fertilité ont montré l'aptitude des semences congelées à restaurer les lignées.

Ces travaux ont permis d'établir la faisabilité et d'initier la mise en place d'une cryobanque aviaire à des fins patrimoniales et de gestion de la diversité génétique.

### Creation of a first gene bank *ex-situ* for *Gallus-gallus*

The aim of the present work was to create a gene bank to be used for the management of genetic diversity in birds. This collection was initiated with the species *Gallus gallus* and contains semen and blood samples stored in optimized conditions of safety and quality.

Three experimental lines raised in controlled safety status and known for their interest for research on metabolism and pathology (R+, Y33, B4); and the oldest traditional French strain (Gauloise dorée) with unknown safety status were chosen. The INRA of Tours was chosen as site of breeding, cleaning up, and semen and blood collection and freezing. A specific cleaning up of the "gauloise dorée" was undertaken and included treatments of the parents, eggs and young to salmonella and mycoplasma. Healthy animals were then raised with a standardised prophylactic program before semen and blood collection. The method of semen freezing used the cryoprotectant glycerol. Semen and blood samples were frozen in 0,5ml straws identified by line or breed, year and number of donor, and then stored in liquid nitrogen in the "Centre de Ressources Biologiques de Touraine (CRBT) created for that purpose and that is also the avian secondary site of the national cryobank of domestic animals (CNAD). Half of the frozen stocks will further be transferred to the primary site of the CNAD to increase the storage security. Semen originating from 8 to 25 males per line or breed was frozen and led to the storage of 6 to 55 semen straws per male, depending on the reproductive efficiency of the males. Fertility tests showed that these frozen semen were efficient to contribute to the restoration of the lines or strain. This work established the feasibility and initiated the storage of a germinal cell collection for the *ex situ* management of the species of bird *Gallus gallus*.

## 1. CONTEXTE ET OBJECTIF

Ce projet s'inscrit dans un contexte général critique de gestion de la biodiversité des espèces aviaires domestiques puisque plus de la moitié des races et lignées aviaires domestiques sont actuellement considérées comme en voie d'extinction (Dohner, 2001). Ces populations, généralement représentées exclusivement par des animaux sur pied, sont constamment exposées aux risques sanitaires, à l'appauvrissement génétique chez les lignées sélectionnées très spécialisées et aux difficultés liées à l'augmentation de la consanguinité chez les petites populations.

Dans ce contexte, le projet a visé à jeter les bases d'une collection patrimoniale *ex situ* de lignées aviaires permettant de mieux gérer la diversité génétique, de contribuer à sauvegarder les espèces et lignées en voie d'extinction et plus généralement de conserver les gènes d'intérêt.

Cette collection est constituée de semences et d'échantillons sanguins, congelés dans des conditions de fiabilité, de traçabilité et de contrôles sanitaires optimaux. Rappelons que la cryoconservation d'embryons n'est pas disponible à l'heure actuelle chez les oiseaux. Le projet participe à la construction de la cryobanque nationale d'animaux domestiques (CNAD ; Danchin Burge et Hiemstra, 2004).

## 2. MISE EN PLACE DE L'INFRASTRUCTURE GENERALE DE LA CRYOBANQUE AVIAIRE.

La cryobanque aviaire fait partie de la cryobanque nationale d'animaux domestiques dont le site primaire de stockage est à l'ACSEDIATE (Maisons Alfort), chaque espèce disposant par ailleurs de sites de de stockage secondaires répartis sur le territoire français. Cette cryobanque ne comprenait jusqu'alors que des cellules mammaliennes, pour la plupart issues d'espèces bénéficiant en routine de l'insémination artificielle (IA), y compris pour certaines d'entre elles sous forme de semence congelée, ce qui en facilite beaucoup l'échantillonnage. Chez les oiseaux, l'insémination artificielle est peu employée sauf chez le dindon et la pintade, et la congélation de la semence est très rare. Par ailleurs, le statut sanitaire des oiseaux domestiques est très hétérogène en fonction des élevages d'origine.

Nous avons donc été amenés à mettre en place deux structures complémentaires :

- une structure d'assainissement, d'élevage, de prélèvement et de congélation des échantillons destinés à être stockés.

- un site aviaire de stockage des échantillons congelés, également site de stockage secondaire aviaire de la cryobanque nationale.

### 2.1. Site d'assainissement, d'élevage, de prélèvement et de congélation

Ce site est situé sur le centre INRA de Tours. Il utilise les unités expérimentales UE PAP et UE SRA, ainsi que l'unité de recherche SRA.

L'UE PAP abrite plus particulièrement le site d'assainissement des races ou lignées à statut sanitaire inconnu.

L'UE SRA abrite le site de prélèvement des semences et échantillons sanguins.

L'UR SRA assure la congélation des échantillons et leur stockage transitoire.

En complément, L'UE GFA prend en charge l'élevage des femelles des races anciennes afin de mieux caractériser ces races.

### 2.2. Site de stockage des échantillons congelés

Nous avons mis en place un site de stockage secondaire aviaire de la cryobanque nationale complété par une composante « site actif » permettant de faciliter la gestion des races et lignées dont la semence est congelée.

Afin d'assurer la création de ce site dans les meilleures conditions de qualité, nous avons choisi de nous allier à plusieurs autres institutions publiques françaises implantées à Tours ou dans ses environs pour créer un nouveau « Centre de Ressources Biologiques » local. Ce « Centre de Ressources Biologiques de Touraine (CRBT) » a pour vocation la mutualisation des moyens institutionnels pour l'échantillonnage et le stockage dans l'azote liquide de l'ensemble des échantillons biologiques congelés à des fins de recherche et de développement dans la région. L'existence du CRBT a été concrétisée en 2004 par une contractualisation en GIS regroupant l'INRA, l'INSERM, l'Université François Rabelais de Tours, l'EFS (Etablissement Français du Sang) Centre Atlantique, et l'IRSA (Institut Régional de la Santé). Le CRBT est aussi reconnu comme plateforme RIO.

Le stockage des échantillons congelés est centralisé dans les locaux de l'EFS de Tours dans des conditions standardisées de qualité et de fiabilité.

La structure complète de stockage des échantillons de la cryobanque aviaire est donc en place avec un stockage doublé 1) site primaire de la cryobanque nationale, l'ACSEDIATE, 2) site secondaire aviaire de la cryobanque nationale, mis en place par le projet, l'EFS de Tours. De plus, l'EFS de Tours abrite aussi le site actif de la cryobanque aviaire.

### 3. LES LIGNÉES CONSERVÉES

Le projet a concerné un nombre limité de populations afin d'évaluer la faisabilité de la mise en place et le mode de fonctionnement d'une telle collection.

Le choix a porté sur trois lignées expérimentales de l'INRA remarquables pour leur impact dans les recherches sur le métabolisme et la pathologie, les lignées R+, Y33 et B4 ainsi qu'une race ancienne, choisie pour sa valeur patrimoniale, la Gauloise Dorée, gérée par des éleveurs adhérents de la Fédération Française de Volailles (FFV).

#### 3.1. Caractéristiques des lignées :

Les 3 lignées expérimentales de l'INRA sont des modèles uniques pour différentes disciplines de la recherche. Elles constituent une réserve de gènes bien documentée par des publications et des données informatisées, relevant plutôt du matériel de type II (animaux exceptionnels non inclus dans les schémas de sélection commerciale) de la Cryobanque nationale

*La lignée R+*, issue de sélection divergente sur la consommation alimentaire résiduelle chez la poule pondeuse à œufs bruns, est un modèle d'étude de la régulation de la prise alimentaire et possède un métabolisme énergétique original (Gabbarou et al, 1997 ; Morisson et al, 1997). La lignée R+ est assez consanguine (50%) et reproduite avec 11 familles de pères par génération

*La lignée Y-33* a été sélectionnée pour une amélioration de la croissance à niveau stable de développement musculaire (Le-bihan et al, 1998). Elle est très utilisée pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine des variations de développement musculaire.

Des lignées congéniques possédant toutes le même fond génétique et ne différant que par le *Complexe Majeur d'Histocompatibilité* (CMH) ont été créées par croisements frères-sœurs successifs. Elles ont un fort taux de consanguinité (supérieur à 76%). Parmi ces dernières, *la lignée congénique B4/B4* retenue dans ce projet a été caractérisée sur le plan immunitaire et étudiée pour la résistance aux sarcomes et à la coccidiose.

*La race Gauloise dorée* est une des plus anciennes races françaises de type fermier. Il s'agit d'une volaille de taille moyenne, très active, à œufs blancs, dont le standard est bien défini. Ses effectifs sont limités (2 à 300 individus). Elle relève du matériel de type I (races à effectifs réduits pour lesquelles les risques de disparition sont réels) de la Cryobanque nationale.

Les lignées INRA ont en commun l'existence plus ou moins marquée d'une **subfertilité** liée au caractères génétiques directement sélectionnés (pression sur la croissance pour la Y33, déficit du métabolisme mitochondrial pour la lignée R+) ou consécutive à la succession de nombreuses générations consanguines

(lignée B4/B4). Les performances de reproduction de la gauloise dorée étaient mal connues au début du projet.

#### 3.2. Suivi sanitaire des animaux

Les lignées expérimentales R+ et Y33 de l'INRA sont élevées dans des conditions permettant de contrôler leur statut sanitaire vis à vis des salmonelles et des mycoplasmes, ou vis à vis des nombreux agents recherchés dans les élevages (SSC). La lignée B4/B4 est élevée en statut « Exempt d' Organismes Pathogènes Spécifiés » (EOPS=SPF).

La race Gauloise Dorée est répartie dans des élevages dispersés sur le territoire français et son statut sanitaire était inconnu au début du projet. Nous avons dû mettre en place un système contraignant d'assainissement des animaux afin d'éliminer en particulier un portage important de salmonelles et de mycoplasmes.

L'échantillonnage des animaux en vue de la congélation de la semence n'a été fait que sous forme d'œufs à couvrir (OAC) après traitement anti-infectieux (Baytril 10% buvable via l'eau de boisson) et contrôle sérologique des pères et mères des œufs. Les œufs ont également été traités pendant l'incubation à l'aide de tiamuline (10mg/kg). Les jeunes ont ensuite été élevés en isolateur un à deux mois, traités à la tiamutine soluble buvable 12,5 %, puis contrôlés par PCR sur écouvillons trachéaux. Les mâles ont ensuite été élevés jusqu'à l'âge adulte pour la congélation de la semence en SSC.

### 4 CONDITIONNEMENT DES COQS ET COLLECTES DE SEMENCE.

Gauloises dorées : sur les 10 élevages ayant fourni des OAC au départ, 9 ont donné lieu à des poussins, et seulement 7 à des coqs adultes. 48 coqs ont été logés en cages individuelles classiques, sous 14h d'éclairage quotidien, nourris avec un aliment standard à 12, 5 MJ par jour puis soumis à des collectes bi-hebdomadaires de semence (Burrows et Quinn, 1937) dès la maturité sexuelle ainsi qu'à des tests de qualité de semence. La maturité sexuelle a été tardive (30-35 semaines d'âge); 6 des coqs étaient de bons donneurs, 14 des donneurs médiocres, les coqs restant étant mauvais ou même non donneurs. Les 20 donneurs bons ou médiocres ont été retenus pour les congélations de semence, les 7 bons pour des congélations en semence individuelle et les suivants en semence mélangée à cause des faibles nombres de spermatozoïdes de départ. Finalement, 4 élevages sont représentés dans la cryobanque (Tableau 1) avec près de 500 paillettes stockées.

Y33 : Après un premier essai de collecte de semence sur 21 coqs Y33 dans leurs conditions habituelles d'élevage, (Génération 20 : G20), suivi d'une mue

précoce réduisant la période de reproduction, l'élevage des reproducteurs a été standardisé selon les procédures du guide de congélation des semences aviaires (INRA-SYSAAF, 2002). La deuxième bande ainsi obtenue (G 21) comportait 21 coqs donnant suffisamment de semence. Elle a permis de congeler de 21 à 61 paillettes de semence par coq. Près de 1000 paillettes de semence ont été stockées pour cette lignée (tableau 2).

**R+** : 22 coqs élevés dans des conditions standard ont été retenus à l'âge adulte pour les collectes de semence en fonction de leur diversité d'origine familiale et leur capacité à donner de la semence. Le défaut métabolique du métabolisme mitochondrial des spermatozoïdes de cette lignée (Morisson et al., 1997) n'a pas semblé affecter notablement le nombre de spermatozoïdes produits. Ces animaux ont été capables de fournir de 22 à 55 paillettes par mâles et un total de 994 paillettes de semence pour la lignée (tableau 2).

**B4** : cette lignée s'est avérée particulièrement difficile à manipuler pour la reproduction. La quantité et la qualité de la semence étaient très basses. Ainsi, à partir des 20 coqs élevés dans des conditions standard qui ont pu donner un peu de semence, 474 paillettes ont été stockées (tableau 2).

## 5. CONGELATION, STOCKAGE DES ECHANTILLONS ET TEST DE FERTILITE

Les semences ont été congelées selon la méthode décrite par Seigneurin et Blesbois (1995). Cette méthode consiste à refroidir la semence assez lentement (7°C/mn) en présence de glycerol avec un conditionnement en paillettes 0,5 ml.

Pour chaque coq donneur de paillettes congelées, 15 paillettes de sang ont aussi été congelées (avec 20 % de glycerol). L'ensemble est stocké dans l'azote liquide dans des bonbonnes sécurisées. Chaque paillette est identifiée individuellement avec, pour les semences, un code d'espèce, de lignée, d'année de naissance, les numéros de génération des lignées, du mâle et de l'éjaculat. Cette identification est reliée à un fichier contenant : le nombre d'éjaculats, le nombre de paillettes par éjaculat, la couleur de paillette et le n° du godet recevant les paillettes dans le bidon de stockage.

Afin d'examiner la faisabilité d'une utilisation éventuelle des paillettes de semences congelées pour reconstituer les lignées, un test de fertilité sur femelles hétérologues a été organisé à partir des semences des lignées du projet dont le sperme individuel a été congelé. Seul le test sur la lignée B4 n'a pas encore été réalisé en raison de la faible quantité de paillettes disponibles. Celui-ci est prévu en 2005. Douze paillettes originaires d'un même père ont servi à inséminer 4 femelles Isabrown (poule pondeuse majoritaire en France) à raison de 3

inséminations successives espacées de 4 jours chacune. Les taux de fertilité obtenus avec de la semence congelée varient selon les races ou lignées (Tableau 3). Les différences entre lignées sur l'aptitude à la congélation sont significatives (seuil 5 %,  $\chi^2$  de Pearson). La lignée Y33 donne les meilleurs résultats avec environ 50% d'œufs fertiles. La lignée R+ donne des taux de fertilité significativement plus bas et la gauloise dorée des taux intermédiaires.

*Dans tous les cas, les taux de fertilité obtenus avec les semences congelées permettent la reconstitution des lignées ou races à partir du sperme (à l'exception bien sûr des gènes portés par le chromosome présent uniquement chez la femelle).*

## CONCLUSION

Ce projet a permis de mettre en place l'infrastructure complète nécessaire à l'établissement d'une cryobanque aviaire. Il a aussi assuré la cryopréservation de spermatozoïdes et d'échantillons sanguins de 4 lignées ou races de l'espèce *Gallus gallus*. Il a de plus apporté des solutions techniques pour cryopréserver une population de statut sanitaire incertain et a permis d'évaluer le coût d'une telle opération.

Enfin, nous avons montré que les semences ainsi congelées, même quand elles provenaient de lignées subfertiles, étaient capables de donner des descendants dans tous les cas étudiés. La faisabilité d'une cryobanque aviaire fonctionnelle de semence et de sang est donc maintenant prouvée pour l'espèce *Gallus gallus*. Il reste cependant à assurer la pérennité d'une structure qui ne dispose pas de moyens propres. La variabilité d'aptitude des races et lignées à la cryopréservation de la semence est de plus très élevée et nécessitera dans l'avenir la mise au point de nouveaux prédictors d'aptitude de la semence à être congelée.

## REFERENCES

- Burrows, W.; Quinn, J. 1937. Poultry Science 16: 19-24.
- Danchin-Burge, C. ; Hiemstra, S.J. 2003. Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe, Paris, France, February 23, 15-28
- Dohner, J.V. 2001. The encyclopaedia of historic and endangered livestock and poultry breeds. Yale university press, New Haven, CT, USA
- Gabarrou, JF; Géraert, PA; Picard, M; Bordas, A.1997. Journal of Nutrition, 127: 2371-2376.
- Le bihan-duval, E.; Mignon-Grasteau, S. ; Millet, N. ; Beaumont, C. 1998. Br. Poult. Sci. 39: 346-353.
- Morisson, M.; Bordas, A.; Petit, J.M.; Jayat-Vignoles, C.; Julien, R.; Minvielle, F. 1997. Poultry Science 76, 425-431.
- Seigneurin, F; Blesbois, E. 1995) Theriogenology 43:1351-1358

**Tableau 1-** Elevage d'origine et nombre de paillettes stockées par coq.

Elevage d'origine des coqs	V1	V2	B1	B2	B3	B4	B5	Mm	Gm	Vm	Bm
Nombre de paillettes	40	38	40	39	8	37	32	33	53	70	101

*Dans la première ligne, les lettres B, G, M, V représentent les élevages d'origine. Les n°1, 2, 3, 4, 5 représentent les numéros des coq dont la semence est congelée individuellement, et m les paillettes de sperme mélangé de plusieurs coqs.*

**Tableau 2-** Etat des stocks de la cryobanque aviaire.

Lignée ou Race	Nombre de coqs	Nombre de paillettes minimum par coq	Nombre de paillettes maximum par coq	Nombre de paillettes total par lignée
Y 33	22	21	61	982
B 4	20	7	41	474
R +	22	30	55	994
Gauloise Dorée	20	8	40	491

**Tableau 3-** Fertilité obtenue avec les semences congelées du projet sur un croisement hétérologue avec des femelles Isabrown

Origine des pères	Taux de fertilité Semence congelée
<b>Gauloise dorée</b> : % fertilité N. Œufs Fert/incubés	39 % <sup>b</sup> 108/278
<b>R+</b> : % fertilité N. Œufs Fert/incubés	25 % <sup>c</sup> 64/257
<b>Y33</b> : % fertilité N. Œufs Fert/incubés	52 % <sup>a</sup> 62/120

*Les lettres en exposant indiquent les différences significatives de fertilité entre lignée ou race (seuil 5 %)*