
**CARACTÉRISATION DES DÉFAUTS CELLULAIRES
APRÈS TRANSFERT NUCLÉAIRE CHEZ LE POISSON ROUGE,
ET MISE AU POINT D'UN NOUVEAU MODÈLE
DE CELLULES DONNEUSES EMBRYONNAIRES**

Thèse de Charlène **ROUILLON**¹

Analysée par Jean-Paul **RENARD**²

Directrice de thèse : Catherine LABBE, Directeur de recherche, INRA LPGP, Rennes

Co-directeur de thèse : Pierre -Yves LE BAIL, Directeur de recherche, INRA LPGP, Rennes

Cette thèse d'embryologie porte sur « La caractérisation des défauts cellulaires après transfert nucléaire chez le poisson rouge (*Carrasius auratus*) et la mise au point d'un nouveau modèle de cellules donneuses embryonnaires chez cette espèce ».

Elle s'ouvre par la présentation de deux graphiques mettant d'emblée le lecteur en situation de sidération : au cours des cinquante dernières années, la consommation alimentaire mondiale de poissons a augmenté huit fois plus vite que la population humaine et la part importante des stocks de poissons exploités par la pêche (ressources halieutiques) menace les ressources naturelles. Dans le même temps, les productions de l'aquaculture (ressources de l'élevage) dépassent aujourd'hui celles issues de la pêche. Dans un contexte d'évolution des conditions environnementales, cette expansion ne doit pas se faire au détriment de la diversité génétique des espèces élevées. La conservation des ressources génétiques piscicoles est un enjeu essentiel pour lequel le recours aux cryobanques combiné aux biotechnologies de la reproduction les plus pointues présente des perspectives très intéressantes.

Placé devant une perspective aussi large, le lecteur a besoin de comprendre en quoi ce travail de thèse, mettant de surcroît en avant une technique de recherche aussi décriée que le clonage par transfert de noyau, contribuera à la réalisation d'objectifs finalisés, comme la préservation de la biodiversité d'une espèce !

Charlène Rouillon répond à cette attente avec un document de thèse qui fait ressortir à la fois les enjeux scientifiques, techniques et agronomiques de sa recherche.

La présentation des enjeux scientifiques est introduite par une synthèse des données de la littérature sur l'embryogénèse précoce du poisson, synthèse remarquable par sa clarté et ses illustrations. Elle met d'emblée en valeur les événements cellulaires que déclenche la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde et souligne bien la finesse du processus de l'activation de l'ovocyte requise pour l'achèvement de la méiose et la formation des pronoyaux maternel et paternel. L'évolution des deux noyaux parentaux va alors dépendre de forces

¹ Thèse de doctorat en Biologie et physiologie animales de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agro-Alimentaires, Horticoles et du Paysage, réalisée de 2016 à 2019 dans le laboratoire de physiologie et génomique des poissons (LPGP) de l'INRA (Directeur Pierre - Yves Le Bail) dans le cadre de la formation doctorale « Biologie fondamentale et agronomie » de l'Université de Rennes. Cette thèse a été soutenue le 12 novembre 2019.

² Membre de l'Académie d'agriculture de France, Section 3 « Production animale ».

essentiellement de traction et de glissement s'exerçant sur le pronoyau maternel le long des filaments de microtubules s'organisant à partir d'un centre de synthèse, le centrosome. Cette belle mécanique, dont la cinétique compose avec l'équilibre entre polymérisation et dépolymérisation des filaments, préside à la rencontre des deux pronoyaux, puis à leur fusion en un noyau unique avant la réalisation de la première mitose.

Chez de nombreuses espèces, l'activation de l'ovocyte peut être induite en l'absence de spermatozoïde, notamment chez les poissons, par modification de la composition ionique de l'eau ou simple piqûre de la membrane ovocytaire par un micro capillaire (en verre, par exemple). Mais le développement reste alors partiel. Il s'interrompt au cours de la période de blastulation, après huit divisions de l'œuf chez le poisson rouge, alors que les activités de synthèse du génome embryonnaire prennent le relais des facteurs ovocytaires (facteurs maternels) qui assuraient jusque-là le métabolisme cellulaire.

Ces données interrogent sur la pertinence d'une démarche qui conduit à induire un développement embryonnaire sans spermatozoïde, à partir d'un noyau de cellule (somatique ou embryonnaire) transféré de surcroît dans un ovocyte receveur qui doit être énucléée !

On sait que cette opération peut être compatible avec une reprogrammation complète des activités du génome de la cellule donneuse par le cytoplasme de l'ovocyte, définition même du « clonage par transfert de noyaux » ! Mais jusqu'à quel point une initiation aussi artificielle du processus de développement peut-elle, et même doit-elle, respecter l'enchaînement des événements cellulaires décrit ci-dessus ?

Charlène Rouillon affronte cette interrogation.

Elle montre d'abord, à partir de données bibliographiques que le clonage par transfert de noyaux est compatible avec un développement complet de l'embryon « cloné » mais avec des taux de succès différents selon les espèces : de l'ordre de 15% avec le Poisson zèbre (*Danio rerio*), moins de 10% avec le Medaka (*Oryzias latipes*), mais à peine 1% à ce jour avec le poisson rouge.

L'enchaînement des événements cellulaires, décrit ci-dessus, l'a conduit à s'intéresser à la migration de la chromatine du noyau au sein de l'ovocyte, notamment à l'action du cytosquelette ovocytaire qui se conjugue avec la réalisation du premier cycle cellulaire.

Le cytoplasme de l'ovocyte de poisson rouge, contrairement à celui du Medaka ou du poisson zèbre, est opaque, car riche en vitellus. Ceci rend plus aléatoire l'opération d'énucléation de l'ovocyte receveur.

Charlène Rouillon donne alors priorité à l'étude du phénomène dit de « neutralisation spontanée » de la chromatine maternelle observé dans le laboratoire hôte : jusqu'à 70 % des embryons de poisson rouge obtenus après l'introduction d'un noyau de cellule diploïde dans un ovocyte non énucléée (haploïde) restent diploïdes, porteurs uniquement du génome de l'individu donneur de noyau.

Cette observation a potentiellement des conséquences pratiques importantes puisqu'elle permet d'envisager la mise en œuvre de la technique de transfert de noyaux sans recourir au préalable à l'énucléation du noyau de l'ovocyte receveur

Mais quels mécanismes permettent une élimination aussi efficace et... opportune de l'ADN maternel ?

Au prix d'un important travail d'histologie classique, Charlène Rouillon montre d'abord qu'après fécondation, et dans les conditions expérimentales définies dans son laboratoire, la quasi-totalité des ovules (96 %) expulsent un globule polaire et s'engagent donc dans le

processus d'activation de l'ovocyte. Les premières cellules issues de la division de l'œuf fécondé (blastomères) sont de même taille (division symétrique du cytoplasme) et possèdent chacune un fuseau de division d'apparence normal.

Elle montre ensuite que l'injection du noyau diploïde dans l'ovocyte non énucléée, *via* le canal micropylaire, cette délicate invagination de la membrane ovocytaire qui permet au spermatozoïde d'accéder à l'ovocyte, n'affecte pas la métaphase maternelle (ovocytaire) localisée contre ce canal.

Elle observe alors que le noyau maternel remonte vers la membrane ovocytaire en même temps que l'invagination du micropyle disparaît ; il se localise alors à la base des premières cellules issues de la division de l'œuf, les blastomères, sous le sillon même de leur division. Le noyau maternel est le plus souvent exclu des fuseaux de division ultérieurs. L'ADN donneur quant à lui, localisé sous le micropyle, n'est pas concerné par cette migration et reste jusqu'à l'engagement de la première division, au site de son dépôt au moment de l'injection.

Ces résultats indiquent que cette cinétique d'évènements favorise une première division symétrique de l'œuf issu d'un noyau de blastula. Les deux premiers blastomères sont de taille à peu près égale et la moitié d'entre eux présentent des fuseaux de division normaux avec de meilleures chances de développement jusqu'à l'éclosion alors que ce n'est le cas que pour seulement 8% des œufs issus d'une première division asymétrique.

Ces observations sont de grande qualité. Elles sont illustrées par une iconographie remarquable, poursuivant en cela la longue tradition de l'embryologie classique. Elles permettent à Charlène Rouillon de proposer des cartes des zones de dépôt dans l'ovocyte du noyau donneur (Figs. 77, 80) pouvant optimiser les chances de succès des premières divisions après transfert du noyau somatique.

Les résultats, publiés dans un bon journal scientifique généraliste (*Scientific Reports*), ont été présentés dans deux réunions scientifiques en France et quatre congrès scientifiques internationaux, preuve de l'intérêt qu'ont suscité ces observations. Car l'hypothèse mettant en avant le rôle développemental des tensions mécaniques exercées par la pipette d'injection sur la membrane du chorion, avancée par Charlène Rouillon dans son manuscrit de thèse et superbement décrite (Fig. 77 p.167), est conceptuellement importante. En effet, la caractérisation de déterminants physiques de la division asymétrique des cellules au début du développement fait l'objet d'une littérature scientifique abondante pour la compréhension des mécanismes qui contrôlent l'engagement (ou non) des cellules de l'embryon précoce dans un patron de différenciation donné.

Le modèle cellulaire utilisé ici, l'ovocyte de poisson rouge, est à cet égard particulièrement intéressant sur le plan scientifique. En effet, chez de nombreuses espèces aquatiques, y compris chez les téléostéens, l'étude du rôle physiologique des tensions mécaniques exercées par le canal micropylaire sur la membrane ovocytaire lors du transit du spermatozoïde est rendue complexe par le fait que ce canal a aussi une action chimio-tactile qui favorise sa rencontre avec le gamète femelle.

Or chez le poisson rouge, ce canal dont la structure déjà décrite avec minutie par R. Yanagimashi *et al.* en 2017, et présentée dans le document de thèse (p 20, Fig17), est dépourvu de la glycoprotéine à effet chimiotactique MISA présente chez les autres espèces. Autrement dit, l'ovocyte de poisson rouge est un modèle pertinent pour analyser les conséquences, pour la physiologie de l'ovocyte, des seules tensions mécaniques exercées par le canal micropylaire directement sur le microenvironnement d'un noyau exogène (de fait sa chromatine), que ce noyau soit celui d'un spermatozoïde, ou d'une cellule embryonnaire,

ou d'une cellule somatique. Et ce, dès avant le contact de ce noyau avec la membrane ovocytaire (le chorion) et son entrée dans le cytoplasme de l'ovocyte.

Les mesures *in situ* des forces exercées sur des composants moléculaires cellulaires spécifiques sont, depuis peu, compatibles avec une imagerie 3D (Milad R. Vahid *et al*, 2020 ; DOI. 10.1137/19M1242562), ce qui étend l'intérêt fondamental de l'ovocyte de poisson comme modèle en biologie cellulaire.

Disposer de sources de cellules donneuses plus homogènes que les cellules blastuléennes pour suivre la cinétique des modifications du noyau au cours d'un cycle de division apparaît nécessaire au vu des résultats ci-dessus. Charlène Rouillon s'est engagée dans ce travail en utilisant des cellules de corps embryoïdes, facilement dissociables à partir d'embryons isolés 24 heures après fécondation. Le grand soin apporté à la description des techniques, permettant d'utiliser comme source de noyaux ces cellules au début de leur engagement dans la différenciation tissulaire, est à ajouter au mérite de cette thèse.

La validation expérimentale de ce corpus de données permettra de confirmer l'intérêt du poisson rouge comme espèce de référence pour valider le recours à des techniques, dont le clonage par transfert de noyaux, comme moyen de « sécuriser la conservation des ressources génétiques piscicoles et leur biodiversité » et mettre ainsi en œuvre une recommandation de la Convention sur la Diversité Biologique (CDB) de Rio adoptée en 1992.

C'est avec cet objectif que le poisson rouge a été choisi par le laboratoire d'accueil de Charlène Rouillon. Cette espèce, membre d'une des plus importantes familles de poissons d'eau douce, les Cyprinidés, proche de la carpe qui fait l'objet d'un élevage important dans le monde, est facile à élever avec une reproduction artificielle maîtrisée et un développement embryonnaire rapide. Le projet finalisé du laboratoire passe par la fabrication de chimères pour régénérer les lignées piscicoles issues des cellules embryonnaires congelées.

Mais aujourd'hui, le poisson rouge ne pourrait-il pas apporter plus ? Les données apportées par Charlène Rouillon et les chercheurs du laboratoire de Rennes, tant sur la biologie de cellules embryoïdes que sur l'utilisation de la technique de transfert de noyaux, pourraient déjà être prises en compte en anticipant sur l'édification d'une recherche guidée par la volonté d'associer avancées cognitives et garanties sur le maintien des ressources génétiques aquacoles.

En effet, la publication récente, mais chez le poisson zèbre, de plus de 1000 mutations ciblées obtenues après édition systématique des 636 gènes du chromosome 1, mutations pour la plupart transmissibles à la génération suivante, témoigne de la puissance de la génétique moléculaire appliquée aux poissons (Yonghua Sun *et al*. 2020, bioRxiv preprint-doi:<https://doi.org/10.1101/693853>). Ce développement, à haut débit, des connaissances sur l'organisation et le fonctionnement des génomes de cette espèce, va de pair avec une large mobilisation des ressources de la recherche bio-informatique associée aux innovations institutionnelles. Elles permettent le fonctionnement harmonieux d'importants collectifs de chercheurs, organisés en réseaux d'observations, de collecte et d'enregistrement de données morphologiques, physiologiques, comportementales, recueillies sur chacun des individus des lignées issues de fines réécritures du génome.

Etendue au poisson rouge, cette démarche bénéficierait des deux autres atouts de cette espèce : sa longue durée de vie dans un environnement contrôlé (aquarium) qui permet, par exemple, d'associer résilience et longévité dans des programmes de conservation de lignées aquacoles ; et sa présence dans la vie quotidienne de nombreuses familles ou institutions sociales, un compagnonnage favorable à l'association de la société à la collecte

d'observations phénotypiques venant enrichir les bases de données des stations de recherche.

Le travail de Charlène Rouillon conduit ainsi à renouveler notre regard sur la place du « petit poisson rouge » en recherche : Et cette thèse finalement suggère que, par ses va-et-vient dans son aquarium ou son bassin naturel, le petit poisson rouge peut aussi contribuer à apaiser les relations parfois tendues entre science et société.

L'originalité des résultats des travaux de cette thèse mérite que cette analyse figure sur le site de l'Académie, à titre de valorisation.